



IMPLICATION DE LA CARNOSINE MUSCULAIRE CHEZ LE PORC EN CROISSANCE  
DANS LA DÉTERMINATION DES CARACTÈRES DE QUALITÉ DE LA VIANDE ET  
MESURE DES NIVEAUX D'EXPRESSION DE GÈNES ASSOCIÉS À SON  
MÉTABOLISME

par

Joël D'Astous-Pagé

Mémoire présenté au Département de biologie en vue de  
l'obtention du grade de maîtrise en biologie moléculaire et cellulaire (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, février 2017

Le 9 février 2017

*le jury a accepté le mémoire de Monsieur Joël D'Astous-Pagé dans sa version finale.*

Membres du jury

Marie-France Palin  
Directrice de recherche  
Agriculture et agroalimentaire Canada

Professeur Richard Blouin  
Codirecteur de recherche  
Département de biologie

Professeur Daniel Lafontaine  
Évaluateur interne  
Département de biologie

Professeur Luc Gaudreau  
Président-rapporteur  
Département de biologie

## SOMMAIRE

Pour améliorer la compétitivité de l'industrie porcine, le porc canadien doit être attrayant et présenter un avantage unique qui permettrait à cette industrie de se démarquer des autres produits alimentaires. La carnosine pourrait offrir un tel avantage et ainsi aider l'industrie porcine à obtenir une plus grande part de marché, tout en modifiant les perceptions négatives liées à la consommation de viande. La carnosine fut, en 1900, le premier peptide jamais isolé à partir de matériel biologique. Chez l'homme, certaines propriétés curatives ont été associées à la consommation de carnosine. Ces propriétés peuvent être expliquées, en partie, par la capacité de la carnosine à inhiber la glycation non enzymatique des protéines et leurs agrégations au cours du vieillissement. Mais son potentiel d'améliorer la qualité de la viande de porc est tout aussi intéressant à développer. En effet, la carnosine musculaire agirait comme tampon de pH, ce qui permettrait de ralentir l'acidification dans le muscle squelettique. La carnosine présente également des propriétés antioxydantes, ce qui peut aussi contribuer à améliorer la qualité de la viande. Ce projet de maîtrise fait partie d'un programme de recherche plus large ayant pour objectif d'augmenter la teneur en carnosine musculaire chez le porc en croissance afin de différencier et de donner une valeur ajoutée au porc canadien.

Dans cette étude, nous avons supposé qu'un contenu élevé en carnosine musculaire serait associé à de meilleurs paramètres de qualité de la viande chez le porc en croissance et que l'expression des gènes liés au métabolisme de la carnosine serait modulée chez les porcs ayant différents niveaux de carnosine musculaire, de même que dans les muscles de porcs de différentes races. En second lieu, nous avons supposé que des polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP), observés sur les gènes liés au métabolisme de la carnosine, pourraient aussi affecter le dépôt de carnosine musculaire chez le porc. Un total de 282 porcs de race pure a été utilisé pour ce projet, incluant 85 Duroc, 92 Landrace et 105 Yorkshire, lesquels provenaient de 16 producteurs différents à travers le Canada. Ces porcs sont entrés à la station de Deschambault (Quebec, Canada) entre 10 à 16 jours d'âge, ont tous été élevés dans des

conditions similaires et abattus à 120 kg de poids vif. Les carcasses ont été suivies individuellement à l'abattoir pour permettre l'échantillonnage du muscle *longissimus thoracis* immédiatement après la mort de l'animal et de prendre les mesures de qualité de la viande, 24 h postmortem. Les valeurs de qualité de la viande et de carnosine musculaire étaient disponibles au début de ce projet de maîtrise (projet de recherche antérieur). Dans un premier temps, les niveaux d'expression génique de gènes du métabolisme de la carnosine ont été mesurés par la méthode de PCR en temps réel. Les gènes sélectionnés incluent des enzymes (ABAT, 4-aminobutyrate aminotransferase; CARNS1, carnosine synthase 1; CNDP1, CNDP dipeptidase 1; CNDP2, CNDP dipeptidase 2; HDC, histidine decarboxylase) et des transporteurs (SLC6A6, solute carrier family 6, member 6; SLC15A1, solute carrier family 15, member 1; SLC15A2, solute carrier family 15, member 2; SLC15A3, solute carrier family 15, member 3; SLC15A4, solute carrier family 15, member 4; SLC36A1, solute carrier family 36, member 1) reliés au métabolisme de la carnosine. Les gènes ABAT, CNDP1, HDC, SLC15A1 et SLC15A2 ont été abandonnés puisque leurs transcrits étaient indétectables ou présents à de très faibles quantités. En ce qui concerne les autres gènes, l'analyse des résultats a révélé un effet de race pour l'expression génique de CARNS1, CNDP2 et SLC36A1, les valeurs les plus élevées étant observées chez les porcs de race Duroc, lesquels présentent également des niveaux plus élevés en carnosine musculaire. Pour chaque race, les animaux ont été regroupés en trois catégories selon leur teneur en carnosine musculaire (Bas, Moyen et Élevé). Pour les Duroc, l'abondance en ARNm de la CARNS1 est plus élevée pour le groupe Bas que pour les groupes Moyen et Élevé en carnosine. Ce résultat laisse croire à un possible rétrocontrôle de la carnosine musculaire sur la transcription de la CARNS1, l'enzyme responsable de sa synthèse. Pour les gènes SLC15A3 et SLC15A4, nous observons des niveaux d'ARNm plus élevés chez les animaux à haute teneur en carnosine. Ainsi, des niveaux plus élevés de carnosine musculaire pourraient entraîner une augmentation de la transcription de SLC15A3 et SLC15A4, deux gènes impliqués dans le transport de la carnosine. Dans un deuxième temps, l'effet de la quantité de carnosine musculaire sur différents caractères de qualité de la viande a aussi été étudié. Ces résultats nous démontrent que les porcs ayant des niveaux de carnosine élevés, présentent également une meilleure qualité de la viande, tel que démontré par un pH à 24h plus élevé, une meilleure capacité de rétention d'eau et une diminution des indices de

couleur b\* (couleur jaune) et L\* (luminance). Enfin, une recherche de polymorphismes d'ADN a aussi été effectuée sur quatre gènes cibles (CARNS1, SLC6A6, SLC15A3 et SLC15A4) ayant un fort potentiel d'affecter les niveaux de carnosine musculaire. Les séquences codantes et 3'UTR de chacun de ces gènes ont tout d'abord été séquencées sur une population restreinte de 28 Duroc, 27 Landrace et 30 Yorkshire, incluant des porcs présentant de faibles et de hauts niveaux de carnosine musculaire. Un total de 27 SNPs ont été identifiés pour ces quatre gènes. De ce nombre, quatre SNPs furent sélectionnés pour effectuer le génotypage de la population entière (n = 590). De ces SNPs, deux entraînent un changement d'acide aminé dans le gène SLC15A4 (SNP c.658A>G : Ile220Val; SNP c.818G>A : Ser273Asn)) et deux autres SNPs dans le gène SLC15A3 se retrouvent sur un site reconnu par un micro-ARN (c.\*35C>T and c.\*52C>T). Des analyses d'association ont ensuite été effectuées afin de déterminer l'effet des différents SNPs et diplotypes sur les caractères de qualité de la viande et sur les niveaux de carnosine et d'ansérine (analogue méthylé de la carnosine). Nos résultats démontrent qu'une sélection en faveur du génotype c.658AA ou du diplotype AA/GG pour le gène SLC15A4 résulterait en une augmentation de carnosine musculaire et une amélioration de certains paramètres de qualité de la viande tels que la couleur, la rétention d'eau et le pH à 24 h.

Collectivement ces résultats montrent que les porcs présentant de hauts niveaux de carnosine musculaire présentent également une meilleure qualité de la viande. De plus, les niveaux d'expression de certains gènes du métabolisme de la carnosine sont modulés selon la race de porc (influence génétique possible) et aussi selon le contenu de carnosine musculaire. Enfin, une amélioration générale de la qualité de la viande serait possible par la sélection d'allèles favorables du gène SLC15A4. Cependant, les fréquences observées pour les allèles mineures du SNP c.658A>G (i.e. Duroc, 0.01; Landrace, 0.09) suggèrent une amélioration génétique limitée chez les Duroc et les Landrace.

**Mots-clés :** Carnosine, Expression génique, Muscle *longissimus thoracis*, Polymorphisme nucléotidique (SNP), Porc, Qualité de la viande.

## REMERCIEMENTS

La réussite de cette maîtrise n'aurait pu être possible sans l'engagement, l'écoute et les judicieux conseils de ma directrice Mme Marie-France Palin et de mon codirecteur, M. Richard Blouin. Je vous remercie grandement.

Je voudrais aussi remercier l'Université de Sherbrooke et Agriculture Canada; deux institutions qui ont permis de mener à bien ma formation.

Je tiens à remercier Mme Danièle Beaudry pour son expertise technique. Merci encore pour les immunobuvarages.

Un gros merci à M. Steve Méthot pour les analyses statistiques, ses explications et sa patience.

Je remercie également mon entourage qui a su m'encourager et me soutenir durant ces deux années. Vous avez ainsi participé au succès de ce projet. Merci Maman. Merci Papa. Merci Andréanne.

Enfin, je remercie également Agriculture et Agroalimentaire Canada, Swine Innovation Porc, Canada Porc International, le Conseil Canadien du Porc (CCP), le Centre de Développement du Porc du Québec (CDPQ) et le Centre Canadien pour l'Amélioration des Porcs (CCAP) pour leurs supports financiers pour le projet.

## TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iv
REMERCIEMENTS .....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	xii
LISTE DES TABLEAUX .....	xiii
LISTE DES FIGURES .....	xv
CHAPITRE 1 – INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	15
1.1. La production porcine au Canada .....	15
1.2. La carnosine .....	17
1.2.1. La carnosine chez l’humain .....	19
1.2.1.1. Rôles physiologiques de la carnosine dans le muscle squelettique .....	20
<i>Maintien de l’homéostasie intracellulaire pendant la contraction</i> .....	20
<i>Régulation du couplage excitation-contraction</i> .....	21
<i>Propriétés anti-réticulation et anti-glycation des protéines</i> .....	22
1.2.1.2. Enzymes et transporteurs impliqués dans le métabolisme de la carnosine .....	23
<i>La carnosine synthase</i> .....	23
<i>Les carnosinases</i> .....	24
<i>Les transporteurs de carnosine, <math>\beta</math>-alanine et L-histidine</i> .....	25
<i>Autres gènes liés au dépôt de carnosine musculaire</i> .....	27
1.2.1.3. Facteurs déterminant la quantité de carnosine musculaire .....	29
<i>La supplémentation en <math>\beta</math>-alanine et en carnosine</i> .....	29
<i>L’activité physique</i> .....	30
1.2.1.4. Utilisation actuelle de la carnosine .....	31
1.2.1.5. Utilisation future de la carnosine .....	32
<i>Le cancer</i> .....	32
<i>Le diabète</i> .....	33



<i>Les maladies neurodégénératives</i> .....	33
1.2.2. La carnosine chez le porc .....	35
1.2.2.1. La carnosine musculaire chez le porc .....	35
1.2.2.2. Effets de la carnosine sur la stabilité oxydative de la viande de porc (expériences in vitro) .....	36
1.2.2.3. Effets de la carnosine ou de la $\beta$ -alanine sur la qualité de la viande et la stabilité oxydative chez le porc (expériences in vivo) .....	37
1.2.2.4. Composante génétique influençant le dépôt de carnosine musculaire chez le porc .....	39
1.3. Hypothèse et objectifs .....	41
 CHAPITRE 2 – PREMIER ARTICLE RÉDIGÉ .....	 43
2.1. Présentation du premier article .....	43
2.2. Référence .....	43
2.3. Implication de l’auteur dans l’article .....	44
2.4. Impact de cet article .....	44
2.5. Carnosine content in the porcine <i>longissimus thoracis</i> muscle and its association with meat quality attributes and carnosine-related gene expression .....	46
2.5.1. Abstract .....	47
2.5.2. Introduction .....	47
2.5.3. Materials and methods .....	49
2.5.3.1. Animals and tissue samples collection .....	49
2.5.3.2. Meat quality measurements .....	50
2.5.3.3. Skeletal muscle carnosine content quantification .....	54
2.5.3.4. Relative mRNA abundance analyses using quantitative PCR assays .....	54
2.5.3.5. Tissue distribution analyses .....	56
2.5.3.6. CARNS1, SLC15A3 and SLC15A4 protein quantification .....	57
2.5.3.7. Statistical analyses .....	59
2.5.4. Results and Discussion .....	60
2.5.4.1. Carnosine content in the pig <i>longissimus thoracis</i> muscle .....	60

2.5.4.2. Expression of carnosine-related genes in the pig longissimus thoracis muscle	62
2.5.4.3. Tissue distribution of carnosine-related genes transcripts.....	66
2.5.4.4. Carnosine-related gene mRNA abundance in the skeletal muscle of different pig breeds and muscle carnosine content .....	69
2.5.4.5. Muscle CARNS1, SLC15A3 and SLC15A4 protein abundance in pigs with different muscle carnosine content .....	74
2.5.4.6. Muscle carnosine content and longissimus thoracis meat quality attributes .....	75
2.5.5. Conclusions .....	78
2.5.6. Acknowledgements .....	79
2.5.7. References .....	80
CHAPITRE 3 – DEUXIÈME ARTICLE RÉDIGÉ .....	87
3.1. Présentation du deuxième article .....	87
3.2. Référence .....	87
3.3. Implication de l’auteur dans l’article .....	88
3.4. Impact de cet article .....	88
3.5. Identification of single nucleotide polymorphisms in carnosine-related genes and effects of genotypes and diplotypes on pork meat quality attributes.....	90
3.5.1. Abstract.....	91
3.5.2. Introduction .....	91
3.5.3. Materials and methods.....	94
3.5.3.1. Animals, tissue sample collection and phenotypes .....	94
3.5.3.2. SNP screening .....	95
3.5.3.3. DNA extraction and SNP genotyping .....	97
3.5.3.4. Transcript abundance of SLC15A3 and SLC15A4 genes in the longissimus thoracis muscle .....	99
3.5.3.5. Statistical analyses.....	100
3.5.4. Results and discussion.....	101
3.5.4.1. Polymorphism identification .....	101

3.5.4.2. Allele and genotype frequencies and deviation from Hardy-Weinberg equilibrium .....	102
3.5.4.3. SLC15A3 and SLC15A4 haplotype frequencies.....	105
3.5.4.4. Association analyses.....	106
3.5.5. Conclusions .....	113
3.5.6. Acknowledgements .....	114
3.5.7. References .....	115
 CHAPITRE 4 – DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION .....	 119
 BIBLIOGRAPHIE .....	 125

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABAT	4-aminobutyrate aminotransferase
AGE	“advanced glycation end-product”
ATPGD1	“ATP-Grasp Domain-Containing Protein 1”
CARNMT1	carnosine-N-méthyltransferase
CARNS1	carnosine synthase 1
CNDP1	CNDP dipeptidase 1
CNDP2	CNDP dipeptidase 2
HCD	“histidine-containing dipeptide“
HDC	“histidine décarboxylase“
mRNA	ARN messenger
miRNA	Micro-ARN
PAT1	“proton/amino acids transporter 1“
PEPT1	“peptide transporter 1“
PEPT2	“peptide transporter 2“
PHT1	“peptide/histidine transporter 1“
PHT2	“peptide/histidine transporter 2“
PTG	produits terminaux de glycation
QTL	“quantitative trait loci”
RS	réticulum sarcoplasmique
ROS	“reactive oxygen species”
SLC6A6	“solute carrier family 6, member 6”
SLC15A1	“solute carrier family 15, member 1”
SLC15A2	“solute carrier family 15, member 2”
SLC15A3	“solute carrier family 15, member 3”
SLC15A4	“solute carrier family 15, member 4”
SLC36A1	“solute carrier family 36, member 1”
SNP	“single-nucleotide polymorphism”
TAUT	“taurine transporter“

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Concentration de la carnosine dans la viande de différents animaux destinés à la consommation humaine (Adapté de Aristoy & Toldrá, 2004).....	19
Article 1		
Table A1.	Descriptive statistics of meat quality attributes measured in the <i>longissimus thoracis</i> muscle of Duroc, Landrace and Yorkshire pigs. ....	53
Table A2.	Primer sequences used for quantitative RT-PCR and tissue distribution analyses. ....	56
Table A3.	mRNA abundance of carnosine-related enzymes and transporters in human ( <i>gastrocnemius</i> ), mouse ( <i>tibialis anterior</i> ) and pig ( <i>longissimus thoracis</i> ) skeletal muscles. ....	64
Table A4.	Meat quality parameters in the <i>longissimus thoracis</i> muscle of Low, Medium and High groups of muscle carnosine content within Duroc, Landrace and Yorkshire breed pigs.....	73
Article 2		
Table B1.	Summary statistics (Mean $\pm$ standard deviation) of meat quality traits and anserine and carnosine content in pig <i>longissimus thoracis</i> muscle. .	95
Table B2.	Primer sequences and optimal PCR conditions used for sequencing of the porcine coding and 3'-UTR regions of CARNS1, SLC6A6, SLC15A3 and SLC15A4 genes.....	97
Table B3.	Identification of DNA polymorphisms in the porcine CARNS1, SLC6A6, SLC15A3 and SLC15A4 genes. ....	98

Table B4.	Primer sequences used to amplify regions of the porcine SLC15A3 and SLC15A4 genes containing DNA polymorphisms and MGB probes used for genotyping.....	99
Table B5.	Genotype and minor allele frequencies of DNA polymorphisms within the SLC15A3 and SLC15A4 genes in Duroc, Landrace and Yorkshire pigs. ....	104
Table B6.	Haplotype frequencies for the SLC15A3 and SLC15A4 genes in Duroc, Landrace and Yorkshire pigs.....	105
Table B7.	Effects of SLC15A3 genotypes on anserine and carnosine content in the <i>longissimus thoracis</i> muscle and on meat quality parameters across breeds.....	107
Table B8.	Effects of SLC15A4 genotypes on anserine and carnosine content in the <i>longissimus thoracis</i> muscle and on meat quality parameters across breeds.....	109
Table B9.	Least square means of anserine and carnosine content and meat quality traits in the <i>longissimus thoracis</i> muscle for the SLC15A3 and SLC15A4 diplotypes. ....	112

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Structure chimique de la carnosine et de ses dérivés naturels (Adapté de Boldyrev et al., 2013). .....	18
Figure 2.	Synthèse et hydrolyse de la carnosine dans la cellule eucaryote.....	24
Figure 3.	Résumé des enzymes et transporteurs impliqués dans le métabolisme de la carnosine chez l’humain (Basé sur les travaux de Boldyrev et al., 2013, Everaert et al., 2013 et Hipkiss, 2009).....	28
Figure 4.	Exemple d’encombrement stérique par la carnosine empêchant l’agrégation de la $\beta$ -amyloïde (Adapté de Aloisi et al., 2013).....	35
Article 1		
Figure A1.	Carnosine content in the <i>longissimus thoracis</i> muscle of Duroc, Landrace and Yorkshire pigs.....	62
Figure A2.	Relative mRNA abundance of CARNS1, SLC6A6, SLC15A3, SLC15A4, CNDP2 and SLC36A1 genes in the brain, duodenum, kidney, liver, lung, <i>longissimus thoracis</i> muscle, and stomach.....	68
Figure A3.	Relative mRNA abundance of carnosine-related genes in the <i>longissimus thoracis</i> muscle of Duroc, Landrace and Yorkshire pigs. ....	70
Figure A4.	Relative mRNA abundance of carnosine-related genes in the <i>longissimus thoracis</i> muscle of pigs within the Low, Medium and High groups based on muscle carnosine content for Duroc, Landrace and Yorkshire pigs.....	72
Figure A5.	Relative content of CARNS1, SLC15A3 and SLC15A4 protein in the <i>longissimus thoracis</i> muscle of pigs within the Low and High of muscle carnosine content. ....	75

# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

### 1.1. La production porcine au Canada

L'importance de l'industrie porcine pour l'économie canadienne est un fait reconnu. En effet, la recette monétaire canadienne de cette production s'est élevée à 3,8 milliards de dollars en 2012 (Statistique Canada, 2014a). Cela fait de cette industrie la troisième en importance au Canada, après l'élevage bovin et la production laitière (Statistique Canada, 2011). De plus, l'industrie porcine génère plus de 45 000 emplois au Canada (Stordy, 2012), dont 28 000 au Québec (MAPAQ, 2016). En 2011, près de 5,8 millions de porcs canadiens ont été exportés vers de grands marchés tels que les États-Unis, le Japon, la Chine et la Russie; ce qui positionne le Canada au troisième rang mondial des pays exportateurs de porcs (Statistique Canada, 2012, 2014b).

Au début des années 2000, l'adoption de nouvelles lois protectionnistes aux États-Unis (Rude et al., 2010; Verret, 2010) et la crainte d'émergence de certaines maladies dans le cheptel canadien ont contribué au ralentissement de la production porcine au Canada, ce qui démontre la vulnérabilité des producteurs faces à une chute de la demande. De plus, la production d'éthanol, majoritairement basée sur le maïs, a exercé une pression à la hausse sur le prix de cet aliment et conséquemment sur l'augmentation des coûts en production porcine (Gougeon, 2012). Afin d'améliorer la santé financière de leur entreprise, les producteurs de porcs doivent réduire l'incidence des maladies tout en diminuant les coûts de production. La réduction des coûts serait possible advenant une diminution du nombre de porcs réformés pour causes de maladies, problèmes de pattes et problèmes reproducteurs, et un meilleur contrôle sur le prix



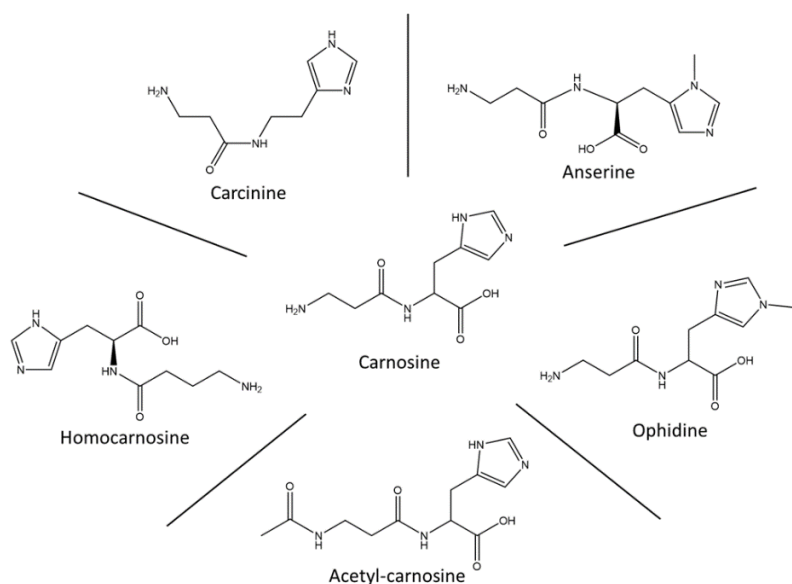
des aliments. L'accès à de nouveaux marchés, grâce au développement de produits différenciés et à valeur ajoutée, permettrait également d'augmenter la marge de profit des producteurs. Pour le consommateur, les principaux facteurs qui interviennent à l'achat de viande sont la qualité de cette viande en termes de tendreté, jutosité et couleur, de même que sa valeur nutritive (ex. peu de gras intramusculaire et saturé). Ainsi, la production d'une viande présentant des attributs santé, tels qu'une augmentation de la quantité de carnosine, pourrait devenir attrayante auprès des consommateurs et ouvrir de nouvelles possibilités de marchés pour cette production animale.

En production porcine, la sélection génétique des 30 dernières années a été concentrée sur la réduction de l'épaisseur du gras dorsal puisque le producteur est payé en fonction du rendement en maigre de ses carcasses. Cependant, la sélection en vue d'améliorer les caractères de qualité de la viande a été peu explorée puisque ces caractères sont peu héréditaires (multigéniques et influencés par l'environnement) et que l'animal doit être sacrifié pour qu'il y ait évaluation des phénotypes. L'arrivée de techniques récentes de biologie moléculaire a contribué à l'amélioration de la qualité de la viande chez les animaux d'élevage. Cependant, la sélection assistée de marqueurs moléculaires a, jusqu'à ce jour, visé essentiellement à l'élimination de certains allèles défavorables (ex. gènes halothane et RN) (Mabry & Baas, 1998; Rothschild & Ruvinsky, 2011) et non pas à la sélection d'allèles associés à une meilleure qualité de la viande. L'identification de nouveaux marqueurs moléculaires associés à l'amélioration de la qualité de la viande, ou encore à l'attribution d'une valeur ajoutée (ex. augmentation de la carnosine musculaire) devient donc une avenue à explorer afin de favoriser l'émergence de nouveaux marchés.

## 1.2. La carnosine

Depuis quelques années, de nouvelles propriétés ont été attribuées à la carnosine en lien avec l'amélioration de la santé musculaire et cognitive chez l'humain. Ces avantages reconnus ont entraîné une augmentation de l'utilisation de la carnosine comme supplément alimentaire chez les sportifs de haut niveau et les personnes âgées (Hipkiss, 2009; Sale et al., 2013). La carnosine est un dipeptide de  $\beta$ -alanine et L-histidine qui se retrouve exclusivement dans les produits animaux tels que la viande de porc (Boldyrev et al., 2013). Comparativement aux autres animaux d'élevage, le porc aurait un meilleur potentiel à accumuler la carnosine au niveau musculaire. Cet avantage pourrait s'expliquer par la présence d'un nombre plus élevé de fibres musculaires de type II (glycolytiques), lesquelles possèderaient une capacité accrue à accumuler la carnosine (Mora et al., 2008). Une augmentation de la quantité de carnosine musculaire chez le porc serait envisageable, que ce soit par sélection génétique ou par supplémentation de  $\beta$ -alanine. Par exemple, la présence de polymorphismes dans les différents gènes impliqués dans le métabolisme de la carnosine pourrait expliquer une partie de la variation de carnosine musculaire observée entre les individus. La sélection d'allèles favorables pourrait ensuite contribuer à augmenter la carnosine dans la viande de porc et ainsi permettre le développement de marchés niches pour une viande présentant des attributs santé. La carnosine possède également des propriétés tampons et antioxydantes, lesquelles pourraient être bénéfiques pour la santé des porcs et contribuer à l'amélioration de la qualité de la viande porcine (Ma et al., 2010). Enfin, la viande de porc enrichie en carnosine serait une excellente valeur ajoutée à développer puisqu'elle permettrait d'obtenir une qualité de viande supérieure et un produit recherché par les consommateurs en raison de ses attributs santé. D'autre part, les bénéfices santé observables sur l'animal ne sont pas négligeables puisque la carnosine pourrait contribuer à diminuer l'incidence des maladies et les coûts de production.

La carnosine fut isolée pour la première fois à partir d'extrait de viande de bœuf en 1900 (Gulewitch & Amdiradzhibi, 1900). Elle est le membre de référence d'une famille de dipeptides comprenant l'ansérine, l'ophidine, l'acetyl-carnosine, l'homocarnosine et la carcinine (Figure 1). On regroupe souvent les trois plus importants (carnosine, ansérine et ophidine) sous l'appellation « *histidine-containing dipeptide* (HCD) » (Boldyrev et al., 2013).



**Figure 1. Structure chimique de la carnosine et de ses dérivés naturels (Adapté de Boldyrev et al., 2013).**

La carnosine et l'ansérine sont présentes exclusivement dans le règne animal où elles se retrouvent en plus grande quantité chez les mammifères terrestres et les oiseaux (Boldyrev et al., 2013; Derave et al., 2010). Le porc et le bœuf produisent aussi de l'ophidine en plus de la carnosine et de l'ansérine. Chez l'humain, seule la carnosine est produite dans les muscles squelettiques (Boldyrev et al., 2013). Le porc, le bœuf et la volaille représentent les sources principales de carnosine dans l'alimentation humaine (Aristoy & Toldrá, 2004; Derave et al., 2010). Le tableau 1 présente les concentrations de carnosine observées dans la viande de différents animaux élevés pour la consommation humaine.

Bien que la carnosine ait été isolée en 1900, l'intérêt pour ce dipeptide est devenu plus évident depuis les vingt dernières années. Tel que mentionné précédemment, l'utilisation de la carnosine chez l'humain se limite principalement aux athlètes de haut niveau et aux personnes âgées et reste encore peu connue du grand public.

**Tableau 1. Concentration de la carnosine dans la viande de différents animaux destinés à la consommation humaine (Adapté de Aristoy & Toldrá, 2004).**

		Carnosine (mg/100 g)	
Mammifères	Porc	Longe	313.0
		Fesse	449.0
		Cou	186.0
	Bœuf	Longe	375.0
		Cou	201.0
	Agneau	Épaule	39.3
		Cou	94.2
Oiseaux	Poulet	Poitrine	180.0
		Cuisse	63.0
	Dinde	Aile	66.0
Poissons	Saumon	0.5	
	Truite	1.6	
	Sardine	0.1	

### 1.2.1. La carnosine chez l'humain

Chez l'humain, le seul HCD présent dans les muscles est la carnosine (Boldyrev et al., 2013) à une concentration approximative de 20.0 mmol/kg poids sec (Mannion et al., 1992) ou de 5-8 mM sur poids humide (Everaert et al., 2011). La carnosine est aussi présente au niveau du système nerveux central (incluant le cerveau) à des concentrations variant de 2 à 5 mM sur

poids humide (Trombley et al., 2000). Enfin, elle se retrouve en quantité beaucoup plus faible dans les autres organes du corps humain (Hipkiss, 2009). Parmi les facteurs pouvant faire varier la quantité de carnosine musculaire chez l'humain, nous retrouvons le sexe, l'âge, le régime alimentaire et la génétique. Ainsi, il a été démontré que les femmes ont généralement des quantités moindres de carnosine musculaire et qu'une diminution de la quantité de carnosine musculaire est également observée lors du vieillissement (Everaert et al., 2011; Hipkiss, 2009). La carnosine musculaire peut être réduite de 50% chez les sujets végétariens comparés à des sujets ayant suivi un régime omnivore (Harris et al., 2007). On constate également que la prise de suppléments de  $\beta$ -alanine chez un végétarien entraîne, après 10 semaines de traitement, une augmentation significative (80%) de la concentration de carnosine musculaire (Harris & Stellingwerff, 2013). Enfin, la quantité de carnosine musculaire serait aussi déterminée par une composante génétique, tel que démontré par des niveaux similaires de carnosine musculaire chez des jumeaux monozygotes ( $r = 0.86$ ) comparativement aux jumeaux hétérozygotes ( $r = 0.51$ ) (Baguet et al., 2012).

#### **1.2.1.1. Rôles physiologiques de la carnosine dans le muscle squelettique**

Ces dernières années, l'intérêt accru envers la carnosine est en lien direct avec la découverte de ses multiples rôles dans l'amélioration de la santé humaine, de même que pour son rôle dans la longévité des cellules musculaires et neuronales.

##### *Maintien de l'homéostasie intracellulaire pendant la contraction*

Le rôle physiologique de la carnosine dans la contraction musculaire porte principalement sur la protection contre l'acidose. Dans les cellules musculaires, un des rôles bien connus de la

carnosine est son pouvoir tampon de pH. Dans les cellules eucaryotes, le pH peut être maintenu par plusieurs éléments tels que les protéines, le phosphate inorganique, le bicarbonate et les HCD, dont fait partie la carnosine (Okuma & Abe, 1992). Les peptides contenant de l'histidine sont fréquemment utilisés pour leur pouvoir tampon en raison du pKa de l'histidine qui se situe près du pH physiologique. Chez certains poissons n'ayant pas de HCD dans leurs muscles, l'importance de l'histidine dans la régulation du pH est telle qu'ils possèdent de grandes concentrations d'histidine musculaire utilisée directement sous sa forme libre (Derave et al., 2010). La carnosine offrirait aussi une protection contre les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), lesquels sont produits par exemple lors de la pratique d'un sport intense ou encore lors du vieillissement. Ces ROS nuisent au maintien de l'homéostasie intracellulaire en causant, entre autres, une déstabilisation de la membrane cellulaire suite à la peroxydation des lipides. Les ROS (ex. peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et les superoxydes (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), en présence d'ions ferreux ou autres métaux de transition, produisent des radicaux hydroxyles (.OH) ce qui peut être très dommageable pour la cellule. Puisque la carnosine est un bon chélateur d'ions, la séquestration de ces ions résulte en un effet antioxydant (Derave et al., 2010; Kopec et al., 2013; Schmid, 2010).

### *Régulation du couplage excitation-contraction*

Le couplage excitation-contraction dans les cellules musculaires squelettiques est une chaîne complexe d'évènements menant à la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique (RS) suite à une stimulation électrique. Le calcium ainsi libéré se lie à la troponine C pour permettre la formation de ponts croisés, ce qui engendrera une contraction. Finalement, la réabsorption du calcium dans le RS mettra fin à la contraction (Gordon et al., 2000). Il a été suggéré que la carnosine serait impliquée dans la régulation de plusieurs de ces étapes. Une des actions les plus importantes de la carnosine est qu'elle augmente la sensibilité de l'appareil contractile au couplage du calcium. De plus, il a été démontré que la carnosine a

plus d'effet à ce niveau dans les fibres musculaires de type I que dans celles de type II (Dutka et al., 2012).

### *Propriétés anti-réticulation et anti-glycation des protéines*

Plus récemment, d'autres fonctions ont été associées à la carnosine tel que son effet anti-réticulation des protéines et ses propriétés limitant la formation de produits terminaux de la glycation (PTG; *advanced glycation end-product* (AGE) en anglais) par l'inhibition de la réaction de glycation (Grillo & Colombatto, 2008; Sale et al., 2013). La réticulation correspond à la formation, entre des protéines, d'un ou de plusieurs liens covalents, généralement un pont disulfure. Cette réaction est utilisée par la cellule, entre autres, pour stabiliser les filaments d'actine, mais elle peut aussi être néfaste lorsqu'elle lie des protéines non fonctionnelles, menant à la formation d'agrégats difficilement dégradables (Hipkiss, 2005). Ces agrégats de protéines s'accumulent avec l'âge, surtout dans les tissus à faible régénération (ex. neurones) et sont associés à diverses pathologies telles le diabète, l'athérosclérose et la maladie d'Alzheimer (Grillo & Colombatto, 2008; Krajcovicová-Kudláčková et al., 2002). Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, la carnosine se lie à la  $\beta$ -amyloïde et empêche la formation de plaques amyloïdes par encombrement stérique des sites de liaisons (Aloisi et al., 2013).

La réaction de glycation, ou réaction de Maillard, est une réaction non enzymatique de réduction d'un sucre (carbohydate) avec le groupe amine d'un acide aminé (Krajcovicová-Kudláčková et al., 2002). Les PTG sont les produits issus de cette réaction. La réaction de glycation a d'abord été caractérisée chez des diabétiques de type I dû à la présence d'hémoglobine glyquée. Cependant, cette réaction serait aussi impliquée dans le vieillissement cellulaire et diverses maladies neurodégénératives (Hipkiss, 2005). La

glycation peut altérer l'activité enzymatique des protéines en gênant la liaison du substrat au site actif. Elle peut aussi provoquer des changements de conformation et ainsi modifier le site actif de la protéine. De plus, la glycation peut affecter certaines protéines des parois vasculaires, leur faisant perdre une partie de leurs propriétés mécaniques et les rendant ainsi résistantes aux protéases (Hippkiss, 2005). Les PTG peuvent aussi amplifier et propager les réactions produisant des radicaux libres, ce qui peut augmenter les dommages oxydatifs aux protéines, lipides et à l'ADN (Grillo & Colombatto, 2008). L'action anti-glycation de la carnosine est encore mal comprise, mais le mécanisme présumé est que la carnosine servirait de peptide sacrificiel et serait glycosylée à la place des protéines (Sale et al., 2013).

#### **1.2.1.2. Enzymes et transporteurs impliqués dans le métabolisme de la carnosine**

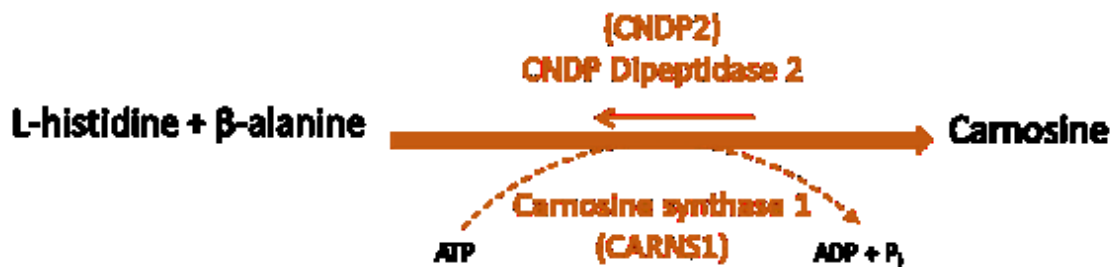
Cette section traite des enzymes impliquées dans la formation et la dégradation de la carnosine, ainsi que les protéines responsables du transport transmembranaire de la carnosine et de ses précurseurs, la  $\beta$ -alanine et la L-histidine.

##### *La carnosine synthase*

Bien que la carnosine soit connue depuis le début du 20<sup>e</sup> siècle, ce n'est qu'en 2010 que l'enzyme responsable de sa synthèse fût identifiée au niveau moléculaire (Drozak et al., 2010). Des biochimistes essayaient de la purifier et la caractériser depuis 60 ans et l'avaient simplement nommée « carnosine synthase », mais peu d'information était disponible sur sa régulation. Grâce aux découvertes faites par Drozak et al., (2010), on a pu confirmer que cette enzyme fait partie de la superfamille des ATP-grasp en raison de son utilisation de l'ATP et à la formation d'ADP et de phosphate inorganique lors de la synthèse de carnosine (Figure 2).



Elle fût tout d'abord nommée ATP-Grasp domain containing protein 1 (ATPGD1) et renommée carnosine synthase 1 (CARNS1) plus récemment. Drozak et al. (2010) démontrèrent également que cette enzyme se retrouve dans la cellule sous forme d'un homotétramère. La séquence protéique de la carnosine synthase comporte 950 aa pour un poids moléculaire d'environ 101 kDa chez l'humain. Le gène de la carnosine synthase se retrouve sur le chromosome 11 (position 11q13) chez l'humain. La CARNS1 est principalement présente dans les muscles squeletiques, bien qu'elle soit aussi exprimée en plus faible quantité dans le cerveau (Drozak et al., 2010). Au niveau cellulaire, il semblerait que son activation soit  $Mg^{2+}$  dépendante (Kalyankar & Meister, 1959).



**Figure 2. Synthèse et hydrolyse de la carnosine dans la cellule eucaryote.**

### *Les carnosinases*

Les peptidases habituellement retrouvées dans les cellules eucaryotes ont en général peu d'affinité pour la carnosine et ses dérivés. Cependant, deux formes de peptidases spécifiques à la carnosine ont été identifiées chez l'humain. Bien qu'elles présentent une homologie de 53% au niveau de leur séquence protéique et qu'elles soient situées une à la suite de l'autre sur le chromosome 18 humain, on différencie facilement ces deux peptidases par leur localisation tissulaire (Unno et al., 2008). La première peptidase à être caractérisée fût la CNDP dipeptidase 1 (CNDP1) qui se retrouve principalement dans le cerveau, le foie, le

sérum sanguin et le rein. La CNDP1 a aussi comme cofacteur le  $Zn^{2+}$  ou le  $Cd^{2+}$  (Pegova et al., 2000). Étant donné la forte activité de CNDP1 dans le sérum sanguin, la carnosine circulante y est rapidement dégradée (Harris et al., 2006). Pour sa part, la CNDP dipeptidase 2 (CNDP2) se retrouve dans différents tissus, dont le muscle squelettique, et a pour cofacteur le  $Mn^{2+}$  (Lenney et al., 1982; Peters et al., 2010). Il a été observé que la CNDP2 a une activité d'hydrolyse beaucoup plus faible que la CNDP1 (Lenney et al., 1982). Cela peut être expliqué par le fait que la CNDP2 a une activité maximale à pH 9,5 ce qui est assez loin du pH retrouvé dans les fibres musculaires (Teufel et al., 2003). Ainsi cette faible activité de la CNDP2 dans les muscles se traduit en un lessivage très lent de la carnosine musculaire (2 à 4% par semaine) après l'arrêt de la prise de supplément en carnosine chez l'homme (Sale et al., 2013).

#### *Les transporteurs de carnosine, $\beta$ -alanine et L-histidine*

Bien que les mécanismes impliqués dans la synthèse et l'hydrolyse de la carnosine soient bien caractérisés, les données disponibles sur les transporteurs de la carnosine et de ses précurseurs sont récentes et plutôt limitées (Boldyrev et al., 2013). La carnosine et ses précurseurs ( $\beta$ -alanine et L-histidine) peuvent être transportés à travers les membranes cellulaires par différents transporteurs. Certains de ces transporteurs font partie de la famille des transporteurs de peptides à force protons-motrice (solute carrier family 15; SLC15). Les deux premiers membres de cette famille sont SLC15A1 et SLC15A2, aussi nommés « peptide transporter 1 (PEPT1) et 2 (PEPT2) ». Ces transporteurs sont surtout responsables de l'absorption ou de la réabsorption de la carnosine, de même que de 400 différents dipeptides et tripeptides (Boldyrev et al., 2013; Gardner et al., 1991). En effet, SLC15A1 permet l'absorption de la carnosine au niveau du petit intestin et son excrétion vers le sang (Bauchart et al., 2007). Bien que peu spécifique, ce transporteur permet l'absorption rapide de la carnosine. Pour sa part, SLC15A2 permet la réabsorption de la carnosine au niveau des reins.

Ce transporteur est beaucoup moins efficace que SLC15A1 pour l'absorption de la carnosine, mais il est beaucoup plus spécifique, ce qui permet une filtration optimale de la carnosine au niveau des reins (Jappan et al., 2009). Les deux derniers membres de la famille SLC15 sont SLC15A3 et SLC15A4, aussi nommés « peptide/histidine transporter 1 (PHT1) et 2 (PHT2) », et sont eux aussi impliqués dans le transport de la carnosine et de ses précurseurs. Contrairement à SLC15A1 et SLC15A2, leur spécificité est beaucoup plus limitée puisqu'elle se limite au transport de l'histidine, de la carnosine et de quelques autres oligopeptides (Sasawatari et al., 2011). Ces transporteurs se retrouvent principalement dans les muscles squelettiques, mais leur expression génique ne semble pas être liée au contenu en carnosine musculaire chez la souris (Everaert et al., 2013). La présence de SLC15A3 a aussi été détectée dans les poumons et les reins chez l'humain (Botka et al., 2000; Everaert et al., 2013). Chez le rat, le profil d'expression entre SLC15A3 et SLC15A4 est assez différent. Chez l'humain, l'expression de SLC15A3 est abondante dans le poumon, la rate et le thymus; très faible dans le cerveau, le foie et le cœur et indétectable dans les tissus rénaux, le duodénum et les tissus musculaires (Sakata et al., 2001). Pour sa part, SLC15A4 est fortement exprimé, chez *Xenopus laevis*, dans le cerveau et les yeux et indétectable dans le rein, l'intestin, le foie, les poumons et les muscles squelettiques (Yamashita et al., 1997). Cependant, les fonctions de SLC15A3 et SLC15A4 restent encore mal définies (Zwarycz & Wong, 2013). Un autre transporteur, nommé « solute carrier family 36, member 1 (SLC36A1) » ou anciennement « proton/amino acids transporter 1 (PAT1) », serait impliqué dans le transport de la  $\beta$ -alanine au niveau du tube digestif (Thwaites & Anderson, 2007). Tout comme SLC15A1, PAT1 est un transporteur de faible affinité mais de haute capacité qui permet le transfert de plusieurs acides aminés, dont la  $\beta$ -alanine et la taurine (Anderson et al., 2009; Thwaites & Anderson, 2011).

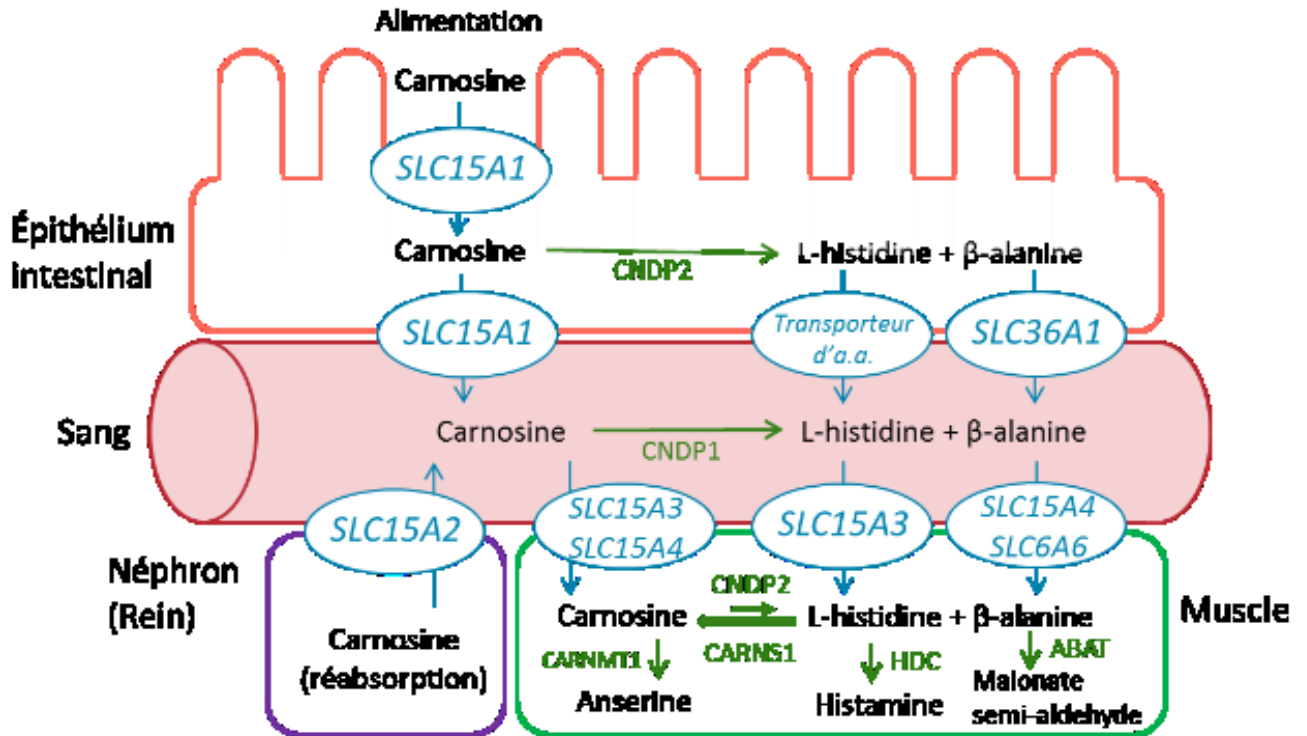
De nouveaux travaux effectués par Harris et al. (2010) ont montré que l'augmentation en carnosine musculaire, induite chez l'homme par la supplémentation en  $\beta$ -alanine, aurait un effet sur la teneur en taurine musculaire. Il en déduit que le transporteur de la taurine

SLC6A6, aussi nommé « taurine transporter (Taut) », jouerait un rôle clé dans le dépôt de carnosine musculaire. De son vrai nom « solute carrier family 6, member 6 », la protéine SLC6A6 est un transporteur de différents substrats dont la taurine et la  $\beta$ -alanine. Ce transporteur dépend d'ions sodium et chlorure pour fonctionner (Uchida et al., 1992). C'est un transporteur très efficace, pouvant créer un gradient de concentration de la taurine 100 fois plus élevé entre le plasma et les tissus (Ito et al., 2010). Everaert et al., (2013) ont suggéré que SLC6A6 serait le principal transporteur de  $\beta$ -alanine dans le muscle squelettique de souris, puisque l'expression génique de SLC6A6 augmente suite à une supplémentation de  $\beta$ -alanine, alors que les niveaux de SLC36A1 restent inchangés. Cependant, Thwaites & Anderson (2011) ont suggéré que SCL36A1 permettrait le transfert en masse de substrats dans les tissus où les transporteurs de la famille SLC6 (ex. SLC6A6) sont saturés.

#### *Autres gènes liés au dépôt de carnosine musculaire*

Il a été proposé par Everaert et al. (2013) que certains gènes peuvent aussi influencer le dépôt de carnosine musculaire en entrant en compétition pour les précurseurs de la carnosine (i.e. ABAT, HDC) ou en transformant la carnosine (i.e. CARNMT1). L'enzyme 4-Aminobutyrate aminotransferase (ABAT) catalyse la transamination de la  $\beta$ -alanine en malonate semi-aldehyde. Bien que ce gène soit lié au transfert de neurotransmetteurs dans le système nerveux central (Parviz et al., 2014), il est aussi fortement exprimé dans les muscles squelettiques de la souris (Everaert et al., 2013). Pour sa part, l'histidine décarboxylase (HDC) catalyse la formation d'histamine à partir de la L-histidine. HDC est surtout retrouvé dans l'estomac et dans les neurones du système nerveux central chez l'humain (Haas et al., 2008), mais est aussi fortement exprimé dans les muscles squelettiques chez la souris (Everaert et al., 2013). Enfin, la carnosine peut être transformée dans les muscles squelettiques en certains de ces analogues. Parmi ceux-ci, l'ansérine est le plus étudié en raison de ses fonctions physiologiques qui seraient très semblables à la carnosine (Ma et al.,

2010). L'ansérine serait produite à partir de la carnosine par une carnosine-N-méthyltransferase (CARNMT1) (Drozak et al., 2013). Pour finir, voici une synthèse du métabolisme connu de la carnosine chez l'humain (Figure 3).



ABAT, 4-Aminobutyrate aminotransférase; CARN1, Carnosine synthase 1; CARNMT1, Carnosine-N-méthyltransferase; CNDP1 et CNDP2, CNDP dipeptidase 1 et 2; HDC, Histidine decarboxylase; SLC6A6, Solute carrier family 6, member 6; SLC15A1, SLC15A2, SLC15A3 et SLC15A4, Solute carrier family 15, member 1, 2, 3 et 4; SLC36A1, Solute carrier family 36, member 1. En bleu les transporteurs et le sens du transport ; en vert les enzymes et le sens de la réaction ; en noir les molécules et les tissus.

**Figure 3. Résumé des enzymes et transporteurs impliqués dans le métabolisme de la carnosine chez l'humain (Basé sur les travaux de Boldyrev et al., 2013, Everaert et al., 2013 et Hipkiss, 2009).**

### **1.2.1.3. Facteurs déterminant la quantité de carnosine musculaire**

Il existe de grandes variabilités interindividuelles en ce qui concerne la concentration de carnosine musculaire. De plus, il a été démontré que le dépôt de carnosine musculaire est stimulé positivement par la puberté chez les hommes, mais pas chez les femmes (Everaert et al., 2011). On observe également une baisse de carnosine musculaire attribuable à l'âge des sujets étudiés (Everaert et al., 2011), les concentrations de carnosine étant plus faibles chez les aînés. De plus, la teneur en carnosine musculaire serait largement déterminée par le bagage génétique de l'individu tandis que les facteurs environnementaux représenteraient le reste de la variation (Baguet et al., 2012). En plus des facteurs liés au sexe, à l'âge et à la génétique, la supplémentation en  $\beta$ -alanine et l'activité physique ont également été identifiés comme des déterminants d'importance pour l'accumulation de carnosine musculaire.

#### *La supplémentation en $\beta$ -alanine et en carnosine*

Plusieurs études ont démontrées qu'accroître la quantité de carnosine dans l'organisme serait bénéfique pour la santé et permettrait d'améliorer les performances sportives chez l'humain (Begum et al., 2005; Derave et al., 2010). En ce qui concerne la carnosine musculaire, il a été démontré qu'elle peut être augmentée de manière substantielle par la prise de suppléments de  $\beta$ -alanine ou de carnosine (Derave et al., 2010; Harris et al., 2006; Stellingwerff et al., 2012). En effet, lors d'une supplémentation en  $\beta$ -alanine, l'augmentation de carnosine musculaire dépend de la dose de  $\beta$ -alanine administrée et de la durée de la supplémentation (Stellingwerff et al., 2012). La supplémentation en  $\beta$ -alanine peut entraîner des effets secondaires comme l'apparition de démangeaisons cutanées (paresthésie) qui surviennent de 10 à 20 minutes après l'ingestion et qui sont de courte durée. Pour éviter ces effets secondaires, la dose maximale recommandée par voie orale est de 1.6 g de  $\beta$ -alanine.

L'apport total quotidien peut toutefois être augmenté en administrant plusieurs doses tout au long de la journée (Sale et al., 2013). Lorsqu'il y a arrêt de la supplémentation en  $\beta$ -alanine, on observe alors une baisse lente (2 à 4% par semaine) et graduelle de la quantité de carnosine musculaire qui se stabilise aux niveaux pré-supplémentation en 9 semaines (Sale et al., 2013). Cette lente diminution de carnosine musculaire n'est pas liée à l'activité de la CNDP1 plasmatique (Everaert et al., 2011), mais serait plutôt en lien avec le pH observé dans les myocytes qui ne serait pas optimal pour la CNDP2, l'enzyme responsable de la dégradation de la carnosine dans le muscle (Teufel et al., 2003). En production animale, il serait intéressant, pour maintenir une quantité élevée de carnosine musculaire, d'inclure dans l'alimentation une source de  $\beta$ -alanine ou de carnosine. Bien que tous les animaux aient la capacité de produire de la carnosine musculaire, il semblerait que le métabolisme de synthèse soit assez différent selon les espèces. C'est pourquoi les connaissances acquises chez l'être humain, en ce qui concerne la supplémentation en  $\beta$ -alanine ou carnosine, ne peuvent être directement transposées au porc ou toute autre espèce animale.

### *L'activité physique*

Il a été suggéré que certains entraînements physiques intenses comme le sprint peuvent modifier le contenu en carnosine musculaire (Suzuki et al., 2004). L'effet de l'exercice sur les niveaux de carnosine musculaire a tout d'abord été observé chez les chevaux de courses, lesquels présentent de très hauts niveaux de carnosine musculaire (Harris et al., 1990). Chez l'homme, la teneur en carnosine du muscle *vastus lateralis* est généralement élevée chez les sprinters et les haltérophiles (Tallon et al., 2005). De plus, la teneur en carnosine du muscle *vastus lateralis* peut être doublée après 8 semaines d'exercice physique intense (Kim et al., 2005). Il a aussi été rapporté que l'augmentation des niveaux de carnosine musculaire suite à un exercice physique intense est plus marquée dans les muscles ayant une forte concentration en fibres de type II (glycolytiques) par rapport aux fibres à contraction lente de type I

(oxydatives) (Hill et al., 2007). Par contre, plusieurs études ont démontré que l'augmentation de l'activité physique n'engendre pas d'augmentation du dépôt de carnosine musculaire à court terme (Everaert et al., 2011; Kendrick et al., 2009). Enfin, Hipkiss et al. (2009) suggèrent que des niveaux élevés de carnosine musculaire sont nécessaires afin d'éviter l'acidose chez les athlètes pratiquant des exercices intenses, et que le corps humain prend un certain temps à s'adapter pour produire plus de carnosine musculaire.

#### **1.2.1.4. Utilisation actuelle de la carnosine**

Les différentes propriétés physiologiques de la carnosine, observées chez l'humain, tels que discutées précédemment, ont mené à différentes utilisations de celle-ci pour en tirer des bénéfices. La compréhension de son rôle dans le maintien de l'homéostasie intracellulaire pendant la contraction musculaire a incité les sportifs de haut niveau à s'y intéresser. Par exemple, il a été démontré que la supplémentation en carnosine a le potentiel d'augmenter la performance physique de haute intensité et d'améliorer la capacité de récupération musculaire (Sale et al., 2013). Des effets bénéfiques et une amélioration des performances ont aussi été rapportés chez des groupes de cyclistes et des nageurs (Hill et al., 2007; Mero et al., 2013). La carnosine est aussi utilisée pour son effet anti-glycation, ce qui permet de contrer les effets du vieillissement et de diminuer les symptômes associés au diabète et aux maladies neurodégénératives. De plus, la carnosine est utilisée pour retarder la progression de la maladie d'Alzheimer en inhibant la formation de plaques amyloïdes. Il s'agit de petits dépôts denses de  $\beta$ -amyloïde qui s'accumulent dans les cellules neuronales, jusqu'à en devenir toxique pour la cellule (Aloisi et al., 2013).



### **1.2.1.5. Utilisation future de la carnosine**

Tel que mentionné précédemment, la carnosine est déjà utilisée à des fins curatives chez l'humain et des études sont en cours afin de déterminer les doses optimales et la meilleure manière d'administrer ce dipeptide. Pour le moment, la majorité des études portent encore sur des modèles animaux dont les résultats ne peuvent être extrapolés vers l'humain.

#### *Le cancer*

Les premiers essais d'utilisation de la carnosine comme molécule anti-cancer furent effectués sur des souris dans les années 80 et démontrèrent la capacité de ce dipeptide à inhiber la croissance de cellules tumorales (Nagai & Suda, 1985). D'autres études démontrèrent également que la carnosine peut ralentir la croissance de lignées de cellules tumorales (Holliday & McFarland, 1996) et qu'elle peut inhiber la prolifération de cellules cancéreuses du côlon humain (HCT116) implantées dans des souris (Horii et al., 2012). Le mécanisme impliqué dans cette inhibition n'est pas encore connu, mais l'hypothèse la mieux acceptée est basée sur la capacité de la carnosine à ralentir la glycolyse intermédiaire et par conséquent, de réduire la production d'ATP. Puisque que la plupart des cellules tumorales dépendent principalement de la glycolyse pour la production d'ATP, l'augmentation de la concentration tissulaire en carnosine devient donc un outil curatif à considérer (Holliday & McFarland, 1996).

### *Le diabète*

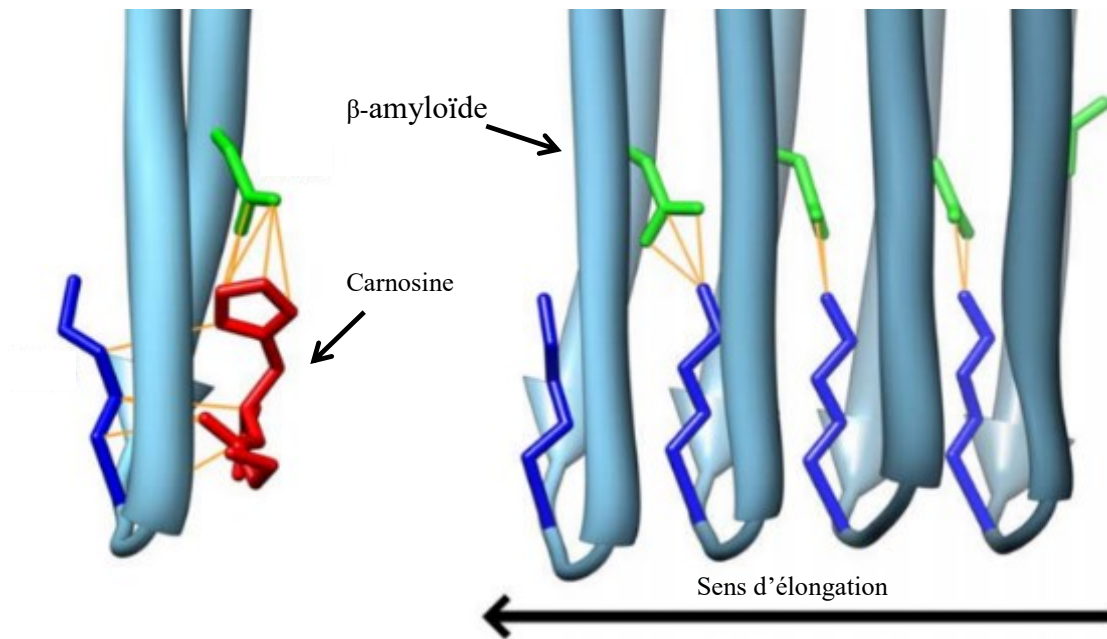
Il était déjà connu, grâce aux recherches effectuées sur des souris (Lee et al., 2005) et des rats (Soliman et al., 2007) diabétiques, que la carnosine a un rôle protecteur contre le diabète en raison de sa capacité à réguler la glycémie. Bien que le mécanisme ne soit pas encore parfaitement compris, il semblerait que la carnosine puisse réduire l'activité neuronale des nerfs sympathiques et faciliter l'activité des nerfs parasympathiques, ce qui aurait pour effet de provoquer à la fois une augmentation de la sécrétion d'insuline et de supprimer la sécrétion de glucagon par le pancréas. Ces activités entraînent ainsi l'effet hypoglycémiant recherché (Nagai et al., 2003). L'effet sur la régulation de la glycémie pourrait aussi être causé par la capacité de la carnosine à protéger les cellules bêta du pancréas, lesquelles sont responsables de la sécrétion d'insuline (Sauerhöfer et al., 2007). La carnosine permet aussi de réduire le développement de pathologies liées au diabète. Entre autres, la carnosine réduirait le risque de maladies oculaires et les problèmes d'insuffisance rénale chronique (Pfister et al., 2011; Riedl et al., 2011).

### *Les maladies neurodégénératives*

Tel que mentionné précédemment, on retrouve chez l'humain des concentrations assez élevées de carnosine dans le système nerveux central, ce qui laisse croire à un effet protecteur possible de la carnosine envers certaines maladies neurodégénératives. Une première étude porte à croire que la carnosine pourrait ralentir la progression de la maladie d'Alzheimer (Preston et al., 1998). La  $\beta$ -amyloïde est un peptide impliqué dans la maladie d'Alzheimer qui est maintenant reconnu pour augmenter le stress oxydatif au niveau des cellules endothéliales et lisses des parois des vaisseaux sanguins du cerveau. Ce stress oxydatif est causé par l'agrégation de la  $\beta$ -amyloïde sous forme de plaques difficilement dégradables par les

protéases et qui deviennent toxiques pour la cellule (Yankner et al., 1990). L'effet protecteur de la carnosine proviendrait à la fois de ses propriétés antioxydantes et de sa capacité à se lier à la  $\beta$ -amyloïde, empêchant ainsi l'agrégation en plaques du peptide (Aloisi et al., 2013; Preston et al., 1998). La figure 4 présente une schématisation de l'encombrement stérique causé par la carnosine et qui empêche l'accumulation de  $\beta$ -amyloïde en plaques.

Il a aussi été rapporté que la carnosine inhiberait la dimérisation de l' $\alpha$ -synucléine, le principal déclencheur de la maladie de Parkinson (Kang & Kim, 2003). De plus, il a été suggéré que l'absorption de quantités excessives de glucose et de fructose cause une accélération de la neurodégénérescence et une augmentation des risques de développer la maladie de Parkinson (Phillipson, 2014). Le principal agent causal serait le méthylglyoxal, un sous-produit de la glycolyse (Münch et al., 2012). De récentes recherches ont démontré que la carnosine inhibe les effets du méthylglyoxal en plus d'influer positivement sur certains événements biochimiques (i.e. transduction du signal et la glycation) associés à la maladie de Parkinson (Hipkiss, 2014). Enfin, un traitement qui combine la carnosine et le Levopoda, une médication contre la maladie de Parkinson, semble améliorer un certain nombre de symptômes neurologiques tels que la rigidité des membres et l'agilité (Boldyrev et al., 2008).



**Figure 4. Exemple d'encombrement stérique par la carnosine empêchant l'agrégation de la  $\beta$ -amyloïde (Adapté de Aloisi et al., 2013).**

## 1.2.2. La carnosine chez le porc

### 1.2.2.1. La carnosine musculaire chez le porc

Peu d'études ont été publiées chez le porc en ce qui concerne la carnosine musculaire et son rôle physiologique dans ce tissu. Aristoy & Toldrá (1998) ont tout d'abord observé des niveaux de carnosine musculaire plus élevés dans les muscles glycolytiques (*longissimus dorsi* et *semimembranosus*) que dans les muscles oxydatifs (*trapezius*, *masseter*) de 6 truies croisées Pietrain x Landrace. Des résultats similaires ont ensuite été rapportés pour 18 porcs de sexe et de race inconnue (Cornet & Bousset, 1999) et, plus récemment, chez 4 truies de race inconnue (Mora et al., 2008). Selon Suzuki et al. (2002), une plus forte concentration en

carnosine serait requise dans les muscles glycolytiques afin de bénéficier du pouvoir tampon de pH de ce dipeptide, ce qui limiterait les effets négatifs associés à une forte accumulation d'acide lactique due au métabolisme anaérobique plus élevé des muscles glycolytiques. La concentration de carnosine musculaire diffère aussi entre les espèces, avec des niveaux plus élevés observés dans le muscle squelettique du cheval, suivis du porc, du bœuf, du poulet, du dindon et du lapin (Peiretti et al., 2011). Le porc peut donc être considéré comme une meilleure source de carnosine musculaire lorsqu'on le compare à d'autres espèces animales élevées pour la viande. Chez la majorité des espèces, la carnosine serait plus abondante dans les fibres musculaires de type II (glycolytiques) que dans celles de type I (oxydatives) (Harris et al., 2012). De plus, le porc présente un nombre plus élevé de fibres musculaires de type II comparativement aux autres animaux d'élevage (Lefaucheur, 2010), ce qui pourrait expliquer, en partie, les niveaux plus élevés de carnosine musculaire observés chez cette espèce.

#### **1.2.2.2. Effets de la carnosine sur la stabilité oxydative de la viande de porc (expériences in vitro)**

Certaines études ont été réalisées chez le porc afin de déterminer le potentiel antioxydant de la carnosine lorsqu'ajoutée à différents échantillons de viande de porc. Decker & Crum (1993) ont par exemple rapporté une diminution des dommages aux lipides (TBARS) lorsque la carnosine (1.5%) est ajoutée à des échantillons de porc haché. À l'opposé, l'ajout de 0.5% carnosine à des échantillons de porc haché et salé n'a eu aucun effet sur l'oxydation des lipides (TBARS), mais des valeurs de pH plus élevées ont tout de même été observées dans ces échantillons, confirmant le pouvoir tampon de la carnosine (Cheng et al., 2007). Plus récemment, ces mêmes auteurs ont de nouveau rapporté que l'addition de 0.5% de carnosine augmente les valeurs de pH dans des échantillons de porc haché et réduit en sel. Dans cette nouvelle étude, ils rapportent également que la carnosine est incapable de réduire les

dommages oxydatifs aux lipides observés après 4 ou 7 jours d'entreposage à 4°C (Cheng et al., 2013). Les résultats présentés dans ces 3 études doivent cependant être considérés avec prudence puisqu'un très petit nombre d'animaux ont été utilisés (n = 2 à 4). De plus, ces résultats ne reflètent pas nécessairement ce qui pourrait être observé chez l'animal vivant.

### **1.2.2.3. Effets de la carnosine ou de la $\beta$ -alanine sur la qualité de la viande et la stabilité oxydative chez le porc (expériences in vivo)**

Tel que mentionné précédemment, les niveaux de carnosine musculaire peuvent être augmentés chez l'humain via une supplémentation en  $\beta$ -alanine ou en carnosine. Chez le porc, la première expérience de supplémentation fut réalisée par Mei et al. (1998). Dans cette étude, les porcs ont reçu 4 traitements différents (n = 8/traitement), soit 1) aucun supplément alimentaire, 2) un supplément de  $\beta$ -alanine (0.225%), 3) un supplément d'histidine (0.40%) ou, 4) un supplément de  $\beta$ -alanine (0.225%) + histidine (0.40%) pendant environ 8 semaines avant l'abattage. Aucune différence significative n'est observée entre les traitements pour les niveaux de carnosine musculaire dans les muscles *longissimus dorsi* et *vastus intermedius*, de même que pour les dommages aux lipides (TBARS) dans des échantillons de porc hachés, cuits et réfrigérés sur une période de 6 jours. Les auteurs de cette étude conclurent que les niveaux de supplémentation étaient probablement insuffisants pour observer des effets significatifs au niveau du muscle squelettique (Mei et al., 1998).

Dans une étude plus récente, Ma et al. (2010) ont supplémenté des porcs (n = 72) avec 4 niveaux de carnosine différents (0, 25, 50 ou 100 mg /kg diète) sur une période de 8 semaines avant l'abattage. Les auteurs rapportent des effets significatifs sur certains paramètres de qualité de la viande, de même que sur divers indicateurs de stabilité oxydative. Par exemple, les porcs ayant reçu le supplément de 100 mg de carnosine présentaient un pH plus élevé à 45

min et à 24 h post-mortem, ainsi qu'une viande plus rouge et des pertes en eau réduites à 48 h post-mortem. En ce qui concerne la stabilité oxydative du muscle *longissimus*, ces mêmes auteurs rapportent que le traitement de 100 mg carnosine réduit les dommages aux lipides (malondialdéhyde) et aux protéines (carbonyl), et augmente l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase dans le muscle, de même que les niveaux d'expression génique de SOD et de la glutathione peroxydase (GPx). Bien que ces résultats soient fort intéressants, les auteurs de cette étude n'ont pas mesuré les niveaux de carnosine musculaire. Le lien direct entre les niveaux de carnosine musculaire et les résultats observés ne peut donc pas être établi avec certitude.

Dans une troisième étude de supplémentation, un total de 40 porcs ont été répartis dans 4 traitements (carnosine 0 ou 0.1% et  $\beta$ -alanine 0 ou 0.03%) en utilisant un arrangement en factoriel 2 x 2 (Bao et al., 2015). Les résultats obtenus montrent que les porcs supplémentés avec la carnosine présentent de meilleures performances en croissance, tel que démontré par un poids final plus élevé et un gain moyen quotidien amélioré. Encore une fois, ces auteurs ne présentent aucune valeur de carnosine musculaire pouvant démontrer l'efficacité des traitements. De plus, aucune valeur de qualité de la viande n'est présentée dans cette étude.

Dans une expérience visant à étudier les effets d'une température ambiante élevée sur la qualité de la viande de porc, Yang et al. (2014) ont observé des niveaux de carnosine musculaire plus faibles chez les porcs exposés à une température de 30 °C (n = 8) que chez les porcs contrôles (22 °C, n = 8). De plus, cette diminution de carnosine s'accompagne d'une diminution d'expression génique de la CARNS1, l'enzyme responsable de la synthèse de carnosine. Les porcs exposés à une température de 30 °C présentent également un pH 24 h plus bas et des pertes en eau (à 48 h) plus élevées que pour les porcs contrôles. Enfin, des corrélations négatives sont observées entre les niveaux de carnosine musculaire et le contenu en malondialdéhyde (dommages aux lipides,  $r = -0.52$ ), les pertes en eau à 48 h ( $r = -0.58$ ) et

la couleur L\* à 24 h ( $r = -0.50$ ). Ces corrélations ont cependant été effectuées sur un nombre restreint d'animaux ( $n = 8$ ) et devront donc être confirmées sur une plus grande population avant de pouvoir valider les effets bénéfiques de la carnosine sur la qualité de la viande et sur la prévention des dommages oxydatifs. La CARNS1 est le seul gène du métabolisme de la carnosine à avoir été étudié chez le porc (Yang et al., 2014). En effet, aucune étude n'a été effectuée pour déterminer le lien entre les niveaux de carnosine musculaire et les carnosinases (CNDP1 et CNDP2) de même que les transporteurs de  $\beta$ -alanine, de L-histidine ou de carnosine chez le porc.

#### **1.2.2.4. Composante génétique influençant le dépôt de carnosine musculaire chez le porc**

La forte corrélation observée chez des jumeaux monozygotes ( $r = 0.85$ ) pour les niveaux de carnosine musculaire chez l'humain (Baguet et al., 2012) et, l'héritabilité modérée rapportée chez le bœuf Angus pour le contenu en carnosine musculaire (Mateescu et al., 2012), suggèrent fortement l'implication d'une composante génétique dans la détermination du contenu en carnosine musculaire. Chez le porc, une seule étude suggère que les niveaux de carnosine musculaire pourraient être influencés par une composante génétique. En effet, ceci a été démontré par des niveaux plus élevés de carnosine musculaire observés dans le *longissimus dorsi* de porcs croisés ID (i.e. Black Footed Iberian x Duroc) que chez des porcs DLY (Duroc x Landrace/Yorkshire) ou MD (Mangalitza x Duroc). Dans cette étude, les auteurs rapportent également une corrélation négative entre les niveaux de carnosine musculaire et les pertes en eau du muscle *longissimus dorsi* et une corrélation positive avec la tendreté (Straadt et al., 2014).

Les séquences codantes des enzymes (ABAT, CARNS1, CNDP1, CNDP2 et HDC) et des transporteurs (SLC6A6, SLC15A1, SLC15A2, SLC15A3, SLC15A4 et SLC36A1) reliés au



métabolisme de la carnosine sont toutes disponibles sur Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) pour le porc et de nombreux SNPs ont été rapportés pour cette espèce dans la banque de donnée dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). Cependant, aucune étude d'association n'a jusqu'à maintenant été réalisée pour déterminer l'effet de certains de ces SNPs sur l'accumulation de carnosine musculaire, de même que sur différents caractères de qualité de la viande chez le porc.

### 1.3. Hypothèse et objectifs

Ce projet de maîtrise fait partie intégrante d'un programme de recherche visant à augmenter la quantité de carnosine musculaire chez le porc. L'objectif final de ce programme de recherche est de produire une viande de porc présentant une valeur élevée en carnosine, obtenue soit par sélection génétique ou par supplémentation de  $\beta$ -alanine dans l'alimentation. Une haute teneur en carnosine musculaire aurait le triple avantage d'être 1) bénéfique pour l'humain qui consomme cette viande compte tenu de ses attributs santé, 2) d'améliorer la santé de l'animal principalement en raison des propriétés antioxydantes de la carnosine et de son pouvoir tampon de pH et 3) d'être bénéfique pour les producteurs et transformateurs puisque la qualité de la viande serait améliorée. Parallèlement, une meilleure connaissance des bienfaits reliés à l'augmentation de l'apport en carnosine dans l'alimentation humaine pourrait résulter en une valeur ajoutée reconnue pour la viande porcine enrichie en carnosine. Ce projet de maîtrise se situe au début de ce programme de recherche et vise principalement à caractériser les niveaux d'expression de gènes du métabolisme de la carnosine en lien avec son dépôt musculaire et la qualité de la viande porcine. Il vise aussi à identifier la présence de polymorphismes dans certains gènes du métabolisme de la carnosine et de déterminer s'il existe des associations entre ces polymorphismes et les niveaux de carnosine musculaire, de même qu'avec différents caractères de qualité de la viande chez le porc en croissance.

Bien que les principaux gènes impliqués dans le métabolisme de la carnosine aient été identifiés chez l'humain et la souris, peu d'information est disponible sur ces gènes et sur les différents facteurs pouvant moduler leur expression chez les animaux d'élevage. De plus, certaines études suggèrent un effet bénéfique de la carnosine sur différents paramètres de qualité de la viande chez le porc. Cependant, le lien direct entre les niveaux de carnosine musculaire et la qualité de la viande porcine reste à démontrer puisque le contenu en carnosine musculaire n'est pas toujours rapporté dans ces études. La démonstration de

l'influence de paramètres génétiques sur l'accumulation de carnosine musculaire (Baguet et al., 2012; Mateescu et al., 2012) pourrait aussi expliquer, en partie, les grandes variations interindividuelles de carnosine musculaire observées chez l'humain, le bœuf et le porc. La présence de polymorphismes dans les gènes responsables de la synthèse et de la dégradation de la carnosine ou du transport de la carnosine et de ses précurseurs pourrait influencer l'expression ou l'activité de ces gènes et ainsi avoir un impact sur le dépôt de carnosine musculaire. Plus spécifiquement, les objectifs de ce projet de maîtrise sont :

1- Caractériser les niveaux de carnosine musculaire, de même que l'expression de gènes du métabolisme de la carnosine (i.e. transporteurs de la carnosine et de ses précurseurs, enzymes responsables de la synthèse et de la dégradation de la carnosine) dans le muscle *longissimus thoracis* de porcs de race pure principalement utilisés au Canada (Duroc, Landrace, Yorkshire).

2- Vérifier si les niveaux d'expression génique observés à l'objectif 1 sont associés à la quantité de carnosine musculaire mesurée chez le porc.

3- Déterminer si les niveaux de carnosine musculaire sont associés à différents paramètres de qualité de la viande chez le porc.

4- Identifier la présence de polymorphismes (SNPs) dans certains gènes du métabolisme de la carnosine et, par une analyse d'association, déterminer si les différents allèles observés pourraient expliquer les différences interindividuelles de carnosine musculaire, de même que les valeurs de différents paramètres associés à la qualité de la viande.

5- Enfin, l'expression des gènes du métabolisme de la carnosine a aussi été mesurée dans différents tissus porcins afin de déterminer lesquels seraient en mesure de synthétiser et dégrader la carnosine et de transporter la carnosine et ses précurseurs.

## CHAPITRE 2

### PREMIER ARTICLE RÉDIGÉ

#### 2.1. Présentation du premier article

L'article qui suit présente les résultats obtenus pour les objectifs 1, 2, 3 et 5 de mon projet de maîtrise (voir page précédente). Plus précisément, cet article présente la caractérisation des niveaux de carnosine musculaire, de même que l'expression de gènes du métabolisme de la carnosine (i.e. transporteurs de la carnosine et de ses précurseurs, enzymes responsables de la synthèse et de la dégradation de la carnosine) dans le muscle *longissimus thoracis* de porcs de race Duroc, Landrace et Yorkshire. Dans cet article, nous avons également vérifié si les niveaux d'expression génique observés à l'objectif 1 sont associés à la quantité de carnosine musculaire mesurée et si les niveaux de carnosine musculaire sont associés à différents paramètres de qualité de la viande chez le porc. Enfin, l'expression génique des gènes du métabolisme de la carnosine a aussi été mesurée dans différents tissus porcins.

#### 2.2. Référence

Le présent article a été accepté par la revue *Meat Science* le 8 novembre 2016 et a été mis sous presse pour une publication prévue en février 2017.

### **2.3. Implication de l'auteur dans l'article**

Les résultats ont été majoritairement produits par l'auteur principal de l'article ainsi que la rédaction de toutes les sections de l'article. Ma directrice, Marie-France Palin, a supervisé les procédures expérimentales ainsi que la rédaction de l'article. Comme un projet de recherche est un travail d'équipe, des collaborateurs ont aussi contribué au niveau technique (Danièle Beaudry et Simon Cliche), des analyses statistiques (Steve Méthot) et au niveau de la révision de cet article (les co-auteurs de l'article).

### **2.4. Impact de cet article**

Dans un premier temps, nos résultats démontrent que les porcs ayant un haut niveau de carnosine musculaire présentent une meilleure qualité de la viande, tel que démontré par des pertes en eau réduites, une couleur de viande améliorée (valeurs de  $b^*$  et  $L^*$  plus faibles) et un pH plus élevé à 24 h. Il serait donc avantageux d'augmenter le contenu en carnosine musculaire afin d'obtenir une viande de porc de qualité supérieure.

Nous rapportons également dans cet article la présence de transcrits pour certains gènes reliés au métabolisme de la carnosine, tels que les enzymes CARNS1 et CNBP2, de même que les transporteurs SLC6A6, SLC15A3, SLC15A4 et SLC36A1, dans le muscle *longissimus thoracis* et dans plusieurs autres tissus. De plus, nous avons aussi observé une modulation de l'abondance des ARN messagers des gènes reliés au métabolisme de la carnosine et des niveaux de carnosine musculaire selon la race des porcs (i.e. Duroc, Landrace et Yorkshire). Ces résultats suggèrent que le bagage génétique de l'animal pourrait aussi influencer la quantité de carnosine musculaire chez le porc. Ainsi, les porcs de race Duroc présentent des niveaux

de carnosine musculaire plus élevés que les Landrace et les Yorkshire. L'utilisation des porcs Duroc en croisements terminaux (i.e. porcs de marchés) permettrait donc d'augmenter les niveaux de carnosine musculaire tout en améliorant la qualité de la viande. Au Québec, les mâles de race Duroc sont actuellement majoritairement utilisés pour être croisés à des femelles F1 Landrace x Yorkshire, et ce, dans le but de produire des porcs commerciaux présentant une bonne croissance et une meilleure qualité de la viande.

Dans cet article, nous avons aussi observé des niveaux plus faibles du transcrit de la CARNS1 dans le muscle squelettique chez les porcs Duroc ayant des niveaux plus élevés de carnosine musculaire. Ces résultats suggèrent que la carnosine pourrait exercer un rétrocontrôle sur la transcription de la CARNS1, le gène impliqué dans la synthèse de la carnosine à partir de la  $\beta$ -alanine et la L-histidine. Une observation similaire a aussi été rapportée précédemment chez la souris (Everaert et al., 2013), avec des niveaux plus faibles du transcrit de la CARNS1 observés dans des conditions de carnosine musculaire plus élevés (i.e. après injection de testostérone à des souris castrées) et, à l'opposé, des niveaux de CARNS1 plus élevés avec une diminution du contenu en carnosine musculaire (i.e. après castration).

Enfin, les effets observés dans cette étude (i.e. qualité de la viande et expression des gènes) sont plus marqués chez les porcs de race Duroc, lesquels présentent des niveaux plus élevés de carnosine musculaire que chez les porcs Landrace et Yorkshire. Cette observation nous amène à nous questionner sur le fait qu'un certain niveau de carnosine musculaire serait peut-être nécessaire avant d'obtenir des effets bénéfiques sur différents caractères de qualité de la viande et sur la modulation de l'expression de certains gènes du métabolisme de la carnosine.

## **2.5. Carnosine content in the porcine *longissimus thoracis* muscle and its association with meat quality attributes and carnosine-related gene expression**

Joël D'Astous-Pagé<sup>a,b</sup>, Claude Gariépy<sup>c</sup>, Richard Blouin<sup>a</sup>, Simon Cliche<sup>c</sup>, Brian Sullivan<sup>d</sup>, Frédéric Fortin<sup>e</sup> and Marie-France Palin<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>*Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, 2500 boul. de l'Université, Sherbrooke, QC, Canada*

<sup>b</sup>*Sherbrooke Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, 2000 College Street, Sherbrooke, QC, Canada*

<sup>c</sup>*Saint-Hyacinthe Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, 3600 boul. Casavant West, Saint-Hyacinthe, QC, Canada*

<sup>d</sup>*Canadian Centre for Swine Improvement, 960 Carling Avenue, Building 75, Ottawa, ON, Canada*

<sup>e</sup>*Centre de développement du porc du Québec, Place de la Cité - Tour Belle Cour, 450 - 2590, boulevard Laurier, Québec, QC, Canada*

\*Corresponding author: Sherbrooke Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, 2000 College Street, Sherbrooke, QC, Canada, J1M 0C8

*E-mail address:* [mariefrance.palin@agr.gc.ca](mailto:mariefrance.palin@agr.gc.ca) (M.F. Palin)

### 2.5.1. Abstract

Muscle carnosine has pH-buffering, antioxidant and carbonyl scavenging properties, which may affect pork quality attributes. Study objectives were to: (1) compare muscle carnosine content and carnosine-related gene mRNA abundance in purebred pigs (n = 282), (2) study the effect of muscle carnosine content on pork quality attributes and gene expression across breeds, and (3) study transcript abundance of carnosine-related genes in various tissues. Pigs were raised under similar conditions and slaughtered at  $120 \pm 4.5$  kg. *Longissimus thoracis* muscles were sampled on the dressing line for gene expression and at 24 h for meat quality measurements. Muscle carnosine content and carnosine-related gene mRNA abundance were modulated according to pig breeds. Greater pH 24 h, better water holding capacity and improved meat color values were found in pigs with high muscle carnosine content. Data suggest that high muscle carnosine is associated with improved pork meat quality attributes. The pig genetic background may be a key determinant for muscle carnosine content regulation.

*Keywords:* Carnosine; Gene expression, *Longissimus thoracis* muscle, Meat quality; Pig.

### 2.5.2. Introduction

Carnosine ( $\beta$ -alanyl-L-histidine) is a naturally occurring dipeptide found in meat, poultry and some fish but not in foods of plant origin (Boldyrev, Aldini & Derave, 2013). Carnosine is found in various tissues, including the skeletal muscle where it regulates the intramyocellular homeostasis and the excitation-contraction coupling by inducing calcium release (Boldyrev, Aldini & Derave, 2013). This dipeptide is also present in pig skeletal muscle with higher



concentrations found in glycolytic than in oxidative muscles (Reig, Aristoy & Toldra, 2013). Because of its great pH-buffering, carbonyl scavenging and antioxidant properties (Boldyrev, Aldini & Derave, 2013), higher carnosine level may bring to pork advantages in terms of meat quality. Indeed, Ma, Jiang, Lin, Zheng and Zhou (2010) recently reported that pigs supplemented with carnosine (100 mg/kg diet) had increased muscle pH values at 45 min and 24 h post-mortem, along with improved redness and drip loss (at 48 h), all parameters associated with better pork quality. However, because muscle carnosine content was not measured in that study, the direct link between muscle carnosine content and meat quality traits was not established. In a more recent paper, Cheng, Wang and Ockerman (2013) reported that addition of 0.5% carnosine to reduced sodium pork patties resulted in increased pH, color L\* and cooking yield values.

The effects of carnosine or  $\beta$ -alanine dietary supplementation on muscle carnosine content in different species including humans (Chan, Decker, Chow & Boissonneault, 1994; Dunnett & Harris, 1999; Everaert, De Naeyer, Taes & Derave, 2013, Culbertson, Kreider, Greenwood & Cooke, 2010; Sale, Saunders & Harris, 2010) are well documented. However, the moderate heritability estimates observed for skeletal muscle carnosine content in Angus cattle (Mateescu et al., 2012) in addition to the varying carnosine level reported among different crossbred pigs (Straadt, Aaslyng & Bertram, 2014) suggest the genetic background of the pig is also a key determinant.

The gene expression of carnosine-related transporters and enzymes was recently investigated in human and mouse skeletal muscles (Everaert, De Naeyer, Taes & Derave, 2013). Among these genes, the CNDP dipeptidase 2 (CNDP2), 4-aminobutyrate aminotransferase (ABAT), solute carrier family 6, member 6 (SLC6A6) and carnosine synthase 1 (CARNS1, tendency) mRNA abundance were found to be higher in the skeletal muscle of mice fed with  $\beta$ -alanine supplement, thus indicating that the expression of carnosine-related genes may play a key role

in controlling muscle carnosine content in high  $\beta$ -alanine availability conditions. In pigs, several  $\beta$ -alanine and carnosine/histidine transporters and carnosine synthesis/hydrolysis enzymes have been cloned and sequenced, but the association between skeletal muscle carnosine content and carnosine-related genes expression has never been investigated. CARNS1 transcript was recently detected in pig skeletal muscle (Yang et al., 2014), however, the expression of carnosine-related genes in different pig tissues has never been reported.

In this study, we hypothesized that increased muscle carnosine content will result in better pork meat quality attributes and that the expression of carnosine-related genes in the pig *longissimus thoracis* muscle would be associated with muscle carnosine content. We further hypothesized that muscle carnosine content and carnosine-related gene mRNA abundance would be modulated by pig breeds. Therefore, our objectives were (1) to compare muscle carnosine and carnosine-related gene mRNA abundance in different pig breeds (Duroc, Landrace and Yorkshire), (2) to study the effect of different muscle carnosine content (Low, Medium and High) on pork meat quality attributes and on carnosine-related gene and protein expression across breeds, and (3) to study the mRNA abundance of carnosine-related genes in various pig tissues (n = 8) in three multiparous crossbred sows (Duroc x Yorkshire-Landrace).

### **2.5.3. Materials and methods**

#### **2.5.3.1. Animals and tissue samples collection**

In this study, a total of 282 purebred barrows (2 piglets/litter) were used, including Duroc (n = 85), Landrace (n = 92) and Yorkshire (n = 105) pigs originating from 16 breeding herds

across Canada. Piglets used for the current study resulted from 33 Duroc, 38 Landrace and 51 Yorkshire purebred sires. These pigs entered the Deschambault test station (Quebec, Canada) between 10 and 16 days old. They were raised under similar conditions and fed *ad libitum* with cube-texture feed, following a 3-phase feeding program. Pigs were slaughtered in a commercial abattoir upon reaching  $120 \pm 4.5$  kg liveweight. Pigs were sent to the abattoir over a six-week period and were all slaughtered with the same procedure. Carcasses were tracked individually at the plant to allow *longissimus thoracis* muscle sampling immediately after slaughter and meat quality measurements 24 h *post-mortem*. For gene expression study, *Longissimus thoracis* muscle tissue samples were collected on line after bleeding from the left side of the carcass and were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80$  °C. *Longissimus thoracis* muscle samples were also obtained from the right side of the carcass at 24 h *post-mortem* for meat quality and carnosine content measurements. For tissue distribution analyses, three multiparous (third parity) crossbred sows (Duroc x Yorkshire-Landrace) were used. Collected tissues were backfat, brain, duodenum, kidney, liver, lung, skeletal muscle and stomach. Tissue samples were collected immediately after slaughter, frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80$  °C. The national guidelines for the care and use of animals were followed as recommended by the Canadian Council on Animal Care (CCAC, 2009) and the experimental protocol was approved by the institutional animal care committee of the Sherbrooke Research and Development Centre (Sherbrooke, Quebec, Canada).

#### **2.5.3.2. Meat quality measurements**

After 24 h of chilling at  $4$  °C, a 3.5 cm slice from the right *longissimus thoracis* muscle, at the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> last ribs, was collected from carcasses and used for standard marbling, pH, drip loss and meat color measurements. The pH values were determined in duplicate with an Accumet Basic AB40 pH meter (Fisher Scientific International Inc., Hampton, NH, USA) equipped with a probe electrode (Mettler-Toledo Ingold Inc., Bedford, MA, USA). After a

30-min blooming period at room temperature, meat color was measured in triplicate using the trichromatic system: lightness ( $L^*$ ), redness ( $a^*$ ) and yellowness ( $b^*$ ) with a Chroma Meter CR-300 colorimeter (Konica Minolta Corp., Ramsey, NJ, USA). Color was also measured subjectively using the Japanese color score method (O'Neill, Lynch, Troy, Buckley & Kerry, 2003). The visual marbling score was determined by a trained technician according to the National Pork Producer Council (NPPC; Berg, 2006). The NPPC standardized numerical marbling scores range from 1.0 (devoid) to 10.0 (abundant) for intramuscular fat content. Drip loss was determined in triplicate using 10 to 15 g cylindrical meat samples obtained with a cork borer and kept at 4 °C for 48 h with EZ-Drip-Loss funnels (Boehringer Ingelheim Vetmedica, Sioux Center, IA, USA). Drip loss was then determined as the difference between initial and final weights, expressed as percentage of initial weight.

Shear force, cooking loss and myofibrillar fragmentation index (MFI) measurements were performed on thawed 11-cm loin portion that has been kept frozen at -20 °C after a 5-day aging period at 4 °C. Cooking loss and shear-force measurements were performed as described in Pouliot et al. (2009) using loin portions that were thawed at 1 °C for 48 h and cooked to 68 °C. A total of 15 cooked sticks (1-cm<sup>2</sup>) of muscle samples, prepared parallel to the fibre axis, were used for cross-sectional shear force measurements using a texturometer (TA.XT2i, Texture Technologies, Scarsdale, NY, USA) fitted with a Warner Bratzler cutting device. Loin portions were weighted before and after cooking to determine cooking loss, which was expressed as percentage of initial weight. The MFI, a measure of the proteolytic-induced degradation of myofibrils, was measured as described in Pouliot et al. (2012). Freezing loss was expressed as percentage of the weight difference between that of the frozen sample and the weight of the thawed and blotted sample after a thawing period of 24 h at 4°C.

For subsequent analysis of moisture, fat and protein content, *longissimus thoracis* muscle samples were vacuum-packed and frozen at -20 °C within 48 h. Moisture content was

determined by placing a known weight of ground meat sample in a Lyo-Tech lyophilizer (Lyo-San Inc., Lachute, QC, Canada) at 20 °C for 68 h. These dried meat samples were then ground to powder and placed in sealed tubes kept at room temperature for fat and protein content analyses. According to the Official Method 991.36 (AOAC, 2007), the intramuscular fat content was determined in duplicate with petroleum ether extraction using a Soxtec Extraction Unit HT 1043 (Foss North America, Brampton, ON, Canada). In accordance with the Official Method 992.15 (AOAC, 2007), the protein content was determined through nitrogen combustion analysis performed in duplicate on a FP-428 analyzer (LECO Corp., St. Joseph, MI, USA). The glycolytic and oxidative capacity of the *longissimus thoracis* muscle was assessed by the activity of lactate dehydrogenase (LDH 1.1.1.27; Bass, Brdiczka, Eyer, Hofer and Pette (1969)) and citrate synthase (CS 2.3.3.1; Srere (1969)), respectively. The glycolytic potential (GP) was obtained following the enzymatic determination of glycogen, glucose, glucose-6-P and lactate in *longissimus thoracis* muscle samples (5 g) as described by Monin, Mejenes-Quijano, Talmant and Sellier (1987). According to this method,  $GP = 2 \times ([\text{glycogen}] + [\text{glucose}] + [\text{glucose-6-P}] + [\text{lactate}])$  and is expressed as  $\mu\text{mol}$  lactate equivalent/g of fresh muscle. Malic enzyme (EC 1.1.1.40) activity was measured using the method describe in Hsu and Lardy (1969). This enzyme provides a reduced equivalent (NADPH) for fatty acid biosynthesis (Leveille & Hanson, 1966). Table 1 presents descriptive statistics for meat quality traits measured in the *longissimus thoracis* muscle of Duroc, Landrace and Yorkshire pigs used in the current study.

Samples ( $0.5 \times 0.5 \times 1.0$  cm) of the right *longissimus thoracis* muscle were also collected for immunohistochemical analysis. Tissue samples were immediately frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen and kept at  $-80$  °C until analysis. Serial cross sections ( $12 \mu\text{m}$ ) were prepared with a cryostat (Model 840, Reichert-Jung, Buffalo, NY, USA) at  $-20$  °C. Determination of muscle fiber types was performed as described in Lefaucheur, Ecolan, Plantard and Gueguen (2002). Details on antibodies and image analysis software used for this

experiment are provided in Li et al. (2015). Muscle fibers were classified as type I, type IIA, type IIX and type IIB.

**Table A1. Descriptive statistics of meat quality attributes measured in the *longissimus thoracis* muscle of Duroc, Landrace and Yorkshire pigs.**

Meat quality attributes	Duroc (n = 85)	Landrace (n = 92)	Yorkshire (n = 105)	Overall (n = 282)
<i>Meat color<sup>1</sup></i>				
Color a*	4.40 ± 1.09	4.33 ± 1.22	4.93 ± 1.23	4.58 ± 1.13
Color b*	6.62 ± 1.30	6.98 ± 1.26	7.02 ± 1.14	6.89 ± 1.02
Color L*	51.78 ± 6.47	53.49 ± 6.18	52.53 ± 5.63	52.62 ± 2.81
Japanese visual color score	3.45 ± 0.64	3.17 ± 0.54	3.32 ± 0.50	3.31 ± 0.46
<i>Water holding capacity</i>				
Cooking loss (%)	17.92 ± 3.73	18.9 ± 2.64	18.76 ± 1.53	18.55 ± 2.00
Drip loss (%)	3.10 ± 2.31	3.86 ± 2.21	3.84 ± 2.28	3.62 ± 2.27
Freezing loss (%)	9.19 ± 2.47	9.56 ± 2.23	9.47 ± 1.82	9.42 ± 2.03
<i>Physical and chemical traits</i>				
Fat content (%)	5.81 ± 1.33	5.23 ± 1.15	5.17 ± 1.18	5.38 ± 1.08
Marbling score NPPC <sup>2</sup>	3.24 ± 0.76	2.10 ± 0.69	2.41 ± 0.74	2.56 ± 0.83
Moisture content (%)	72.11 ± 7.92	72.61 ± 7.66	72.62 ± 10.04	72.46 ± 1.20
MFI <sup>3</sup>	139.99 ± 62.82	148.32 ± 71.39	147.31 ± 70.92	145.25 ± 29.36
pH 24 h	5.68 ± 0.64	5.58 ± 0.82	5.59 ± 0.56	5.62 ± 0.13
Protein content (%)	21.81 ± 2.48	22.3 ± 2.38	22.4 ± 3.14	22.19 ± 0.68
Shear force (N)	24.80 ± 5.98	27.93 ± 6.38	28.08 ± 4.38	27.04 ± 5.52
<i>Glycolytic and oxidative metabolism indicators<sup>4</sup></i>				
CS activity	7.13 ± 1.33	6.59 ± 1.20	6.72 ± 1.31	6.8 ± 1.09
GP	161.39 ± 39.60	164.82 ± 26.83	158.86 ± 22.59	161.56 ± 26.29
LDH activity	2229.22 ± 353.29	2235.72 ± 341.83	2356.66 ± 352.49	2278.85 ± 266.13
ME activity	239.06 ± 100.24	212.82 ± 102.43	239.01 ± 108.65	230.79 ± 59.33

Data represents means ± standard deviations

<sup>1</sup>Color a\*, b\* and L\* are estimated with a Minolta Chroma Meter CR-300 colorimeter. The Japanese color score is estimated based on a scale of 1(pale) to 6 (dark).

<sup>2</sup>The NPPC marbling score is based on a scale of 1 (devoid) to 10 (abundant).

<sup>3</sup>MFI, myofibrillar fragmentation index (scale of 0 to 100).

<sup>4</sup>CS, citrate synthase (IU/g tissue); GP, glycolytic potential (μmol of lactate eq/g tissue); LDH, lactate dehydrogenase (IU/g tissue); ME, malic enzyme (μmoles NADPH\*min<sup>-1</sup>\*g<sup>-1</sup>).

### **2.5.3.3. Skeletal muscle carnosine content quantification**

Carnosine was extracted from *longissimus thoracis* muscle samples and analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a method according to Mora, Sentandreu and Toldrá (2008). The chromatographic separation was performed using an Atlantis HILIC Silica column (4.6 x 150 mm, 3 µm) and an Atlantis HILIC Silica guard column (4.6 x 20 mm, 3 µm) from Waters (Waters Corp., Milford, MA, USA). The two mobile phases consisted of 10 mM ammonium acetate in water/acetonitrile (25:75, v:v for solvent A and 70:30, v:v for solvent B) at pH 5.5. The separation conditions included a linear gradient (0% to 70%) of solvent B for 9 min, followed by 70% of solvent B for 1 min and then back to 0% of solvent B over a 1 min period. The mobile phase was then stable for 10 min (0% solvent B) at a flow rate of 1.4 mL/min. Carnosine was detected at 214 nm. The peaks were analysed using the EMPOWER 2 software (Waters Corp.) and concentrations determined with a standard curve method. L-Carnosine C9625 and L-Anserine A1131 (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) standards were used to identify peaks. The HPLC system included the Waters 717plus Autosampler, Waters 600 Controller and Waters 2996 Photodiode Array Detector.

### **2.5.3.4. Relative mRNA abundance analyses using quantitative PCR assays**

Total RNA extraction and complementary DNA synthesis were performed as previously reported (Labrecque et al., 2009). Real-time PCR assays were performed using a 7500 fast real-time PCR system (Applied Biosystems, Life Technologies, Burlington, ON) to determine the relative mRNA abundance of 4-aminobutyrate aminotransferase (ABAT), carnosine synthase 1 (CARNS1), CNDP dipeptidase 1 and 2 (CNDP1 and CNDP2), histidine decarboxylase (HDC), solute carrier family 6, member 6 (SLC6A6), solute carrier family 15,

member 1, 2, 3 and 4 (SLC15A1, SLC15A2, SLC15A3 and SLC15A4) and solute carrier family 36, member 1 (SLC36A1) in longissimus thoracis muscle samples. Four reference genes (RG) were also amplified for normalisation. These RG includes actin, beta (ACTB), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) and topoisomerase (DNA) II beta (TOP2B). Primers were designed using the primer express 3.0 software (Applied Biosystems, Life Technologies) and are described in Table 2. Amplifications were performed in triplicate in a 10- $\mu$ L reaction volume containing 5  $\mu$ L of 2X Power SYBR® Green Reagent (Applied Biosystems, Life Technologies), 0.05  $\mu$ L of AmpErase (Applied Biosystems, Life Technologies), 1  $\mu$ L of primer solution (concentrations between 150 and 300 nM), 3  $\mu$ L of 15X diluted cDNA, and sterile water to adjust volume at 10  $\mu$ L. Cycling conditions were 2 min at 50 °C, followed by 10 min at 95 °C and 40 cycles of 3 s at 95 °C and 30 s at 60 °C. Standard curves were performed in duplicate in the same conditions using serial dilutions of cDNA as reported previously (Labrecque et al., 2009). The relative mRNA abundance was obtained using the standard curve method as described in the User Bulletin #2 (Applied Biosystems 1997; ABI PRISM 7700 Sequence Detection System). The TOP2B gene was chosen as the best RG based on Norm Finder algorithm results, which allowed the identification of the RG that was the least affected among breeds (Andersen, Jensen & Ørntoft, 2004).



**Table A2. Primer sequences used for quantitative RT-PCR and tissue distribution analyses.**

Gene symbols <sup>1</sup>		Primer sequence 5'-3'	Fragment size (bp)	GenBank accession no.
ABAT	F <sup>2</sup>	GGATGTCCCAGCTCATCACA	91	NM_214263.1
	R	CTTCCTTGCTCCGGTACCA		
ACTB	F	CATCACCATCGGCAACGA	128	XM_003124280.4
	R	GGATGTCGACGTGCACTT		
CARNS1	F	GCGCGACTACGGACTCAAG	120	XM_005660632.2
	R	GCATTCCTCATCCCTCTGG		
CNDP1	F	GACCATACCCATTGCCAGAT	91	XM_005659819.2
	R	GAGAGTGCTCGCCATCATCA		
CNDP2	F	TGATGCACAGGTGGCGATAC	91	NM_001243707.1
	R	TTTCGAGGAATCACGGTCTTG		
GAPDH	F	CCCCAACGTGTGCGTTGT	91	NM_001206359.1
	R	CTCGGACGCCTGCTTAC		
HDC	F	TCTACCTCAGGCATGCCAACT	107	XM_001925342.4
	R	GGACCGAATCACAAACCAGAGT		
HPRT1	F	GACCAGACTTTGTTGGATTTGAAA	94	NM_001032376.2
	R	CAAACATGATTCAAGTCCCTGAAG		
RPL32	F	AGCCCAAGATCGTCAAAAAG	165	AY550039.1
	R	TGTTGCTCCATAACCAATG		
SLC6A6	F	GGCATGTATGTGTTTCAACTCTTTG	130	XM_013982005.1
	R	TCCTCGATCCCGTCATAAAAGT		
SLC15A1	F	AGTGGGCCGAGTACGTTCTG	92	NM_214347.1
	R	TGGGTTGATGTACGTGTAGAAATCG		
SLC15A2	F	GTTGCTGCTGCTGTAGAGATAAAAA	88	NM_001097514.1
	R	CCAGATTCAAGACTTGCAGGAA		
SLC15A3	F	TGGGCATCTTCTTCGCCTATC	129	XM_003122678.5
	R	CTAGCCGGCATTGTTGATGT		
SLC15A4	F	GCGTCGCTTTCATGGTCTTC	105	KF800734.1
	R	GGCACGAATACAGCAGGATCTT		
SLC36A1	F	TGTTGGCTGTACCAGTCGGTTA	106	XM_003134140.4
	R	ACACGAAGAAAGGAATGATGATCTC		
TOP2B	F	AAGACGGCACAAAAGGTAAAG	97	NM_001258386.1
	R	CTTCGGTTTCTTGCTTGTGTTT		

<sup>1</sup>ABAT, 4-aminobutyrate aminotransferase; ACTB, actin, beta; CARNS1, carnosine synthase 1; CNDP1, CNDP dipeptidase 1; CNDP2, CNDP dipeptidase 2; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HDC, histidine decarboxylase; HPRT1, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; RPL32, 60S ribosomal protein L32; SLC6A6, solute carrier family 6, member 6; SLC15A1, solute carrier family 15, member 1; SLC15A2, solute carrier family 15, member 2; SLC15A3, solute carrier family 15, member 3; SLC15A4, solute carrier family 15, member 4; SLC36A1, solute carrier family 36, member 1; TOP2B, topoisomerase (DNA) II beta.

<sup>2</sup>F, forward; R, reverse primers

### 2.5.3.5. Tissue distribution analyses

Tissue distribution analyses of CARNS1, CNDP2, SLC6A6, SLC15A3, SLC15A4 and SLC36A1 mRNA were performed using RT-qPCR assays. For the three crossbred sows (Duroc x Yorkshire-Landrace), total RNA from backfat, brain, duodenum, kidney, liver, lung, skeletal muscle and stomach was extracted and reverse-transcribed as described above. Amplifications were performed as described above (see 2.4) using the same porcine specific

primers (Table 2) and the 60S ribosomal protein L32 (RPL32) as RG. The relative expression of each gene was determined using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method (Livak & Schmittgen, 2001). For each gene, mRNA abundance fold-over values were calculated in each tissue according to the backfat tissue, which was given a value of 1.

#### **2.5.3.6. CARNS1, SLC15A3 and SLC15A4 protein quantification**

The quantification of porcine CARNS1, SLC15A3 and SLC15A4 proteins in the *longissimus thoracis* muscle was determined using slot blot analyses. Protein extraction was performed following the instructions for hard tissue of the Mem-PER™ Plus membrane protein extraction kit (Thermo Fisher Scientific). The CARNS1 and SLC15A4 proteins were found in the soluble proteins phase and SLC15A3 in the membrane proteins phase. Protein concentrations were estimated using the Bio-Rad DC protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Western blot analyses were first performed to validate the primary antibody specificity of chicken IgY antibodies raised against pig CARNS1 and pig SLC15A4 (Immune Biosolutions, Sherbrooke, QC, Canada) and of rabbit IgG antibodies raised against pig SLC15A3 (ab113819; Abcam, Cambridge, MA, USA). Alpaca anti-chicken IgY-HRP conjugated (Aurora® #Y00008, Immune Biosolutions) and goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate (ab97051, Abcam) were used as secondary antibodies. For primary (1:5000 to 1:60000) and secondary antibodies (1:10000 to 1:50000), different dilutions were tested. To confirm antibody specificity, proteins were loaded on an 8% SDS-PAGE gel electrophoresis. A total of 15 µg of extracted proteins was loaded on gels and then transferred to 0.45 µm nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories). Membranes were blocked with TBST (Tris-buffered saline and 0.1% Tween-20) containing 5% skim milk, for 2 h at room temperature. Membranes were then washed 3 times for 10 min in TBST, at room temperature, and incubated overnight in TBST containing 5% skim milk (4 °C) and primary antibodies raised against target proteins. Membranes were then washed 3 times for 10 min in TBST and

incubated for 1.5 h in TBST (5% skim milk) containing secondary antibodies. Blots were washed 3 times for 10 min in TBST and then 2 times for 10 min with TBS to remove Tween-20. Detection of proteins was performed with the chemiluminescent Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Mississauga, ON, Canada) and signals detected with the Fusion FX7 fluorescence and chemiluminescence imaging system (Montreal Biotech, Dorval, QC, Canada). Western blot analyses confirmed the presence of a single band that corresponded to the expected molecular weight for CARNS1 (101 kDa) and SLC15A4 (61 kDa). For SLC15A3, a single band was observed but not at the expected molecular weight (64 kDa). Indeed, a 40 kDa band was found for SLC15A3 in Western Blot analyses.

The quantification of CARNS1, SLC15A3 and SLC15A4 proteins was then performed using Slot blot analyses (n = 60). For each breed, 10 pigs were randomly selected from the High group and 10 pigs from the Low group, based on muscle carnosine content. Each membrane included a standard curve made of serial dilutions of a pool of all extracted protein samples as described in Farmer, Palin and Martel-Kennes (2012). It also included two wells with the undiluted pool, which was used as a quantifying control. Slot blots were performed using a 48-well Bio-Dot SF (slot format) microfiltration apparatus (Bio-Rad Laboratories). Extracted proteins were first denatured (70 °C for 10 min) in a modified 1X Laemmli sample buffer (62.5 mM Tris-HCL, pH 6.8 with 2% SDS and 5% 2-mercaptoethanol). Nitrocellulose membranes were pre-wet with 200 µL of TBS loaded in each well. Upon complete absorption of TBS, 100 µL of denatured protein extracts (8 µg/well) from each muscle sample were deposited in wells and a dried vacuum was applied for 10 min. Membranes were then washed with TBS (200 µL/well) and a dried vacuum applied for 2 min. Membranes were removed from the microfiltration apparatus and ready to be used for immunoblotting analyses. Membranes were blocked in TBST + 5% skim milk and incubated with optimal dilutions of primary (CARNS1, 1:40000; SLC15A4, 1:40000; SLC15A3, 1:30000) and secondary (1:40000) antibodies, as determined with Western blot analyses. Immunoblotting conditions

and protein detection were performed as described above for western blot analyses. A standard curve and experimental samples were present on each membrane and 3 membranes were quantified for each protein (triplicates). All breeds and carnosine groups were represented on each membrane. Slot blot images were quantified using the Fusion FX7 fluorescence and chemiluminescence imaging system (Montreal Biotech). The total slot intensity minus the median local background value, multiplied by slot area, was calculated for each slot volume. Arbitrary quantity units were determined from the respective standard curve values.

#### **2.5.3.7. Statistical analyses**

Results were subjected to analysis of variance using the MIXED procedure of SAS version 9.3 (SAS 2002; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Analyses for the effect of breed on muscle carnosine content and on studied genes mRNA and protein abundance in skeletal muscle were performed using a one-way ANOVA followed by all pair-wise multiple comparisons with a Tukey correction. Using the PROC CORR procedure of SAS, Pearson's correlation analyses were performed to look for association between the mRNA and protein abundance of CARNS1, SLC15A3 and SLC15A4 genes. Tissue distribution analyses were also done using a one-way ANOVA (8 levels), followed by all pair-wise multiple comparisons with a Tukey correction. Calculation of fold values was based on the adjusted means of that analysis.

Using the FASTCLUS and DISCRIM procedures of SAS, pigs were grouped in 3 categories (within each breed) based on their muscle carnosine content (Low, Medium and High). The effect of carnosine content category on mRNA abundance or protein abundance (for CARNS1, SLC15A3 and SLC15A4) and on meat quality attributes was then determined

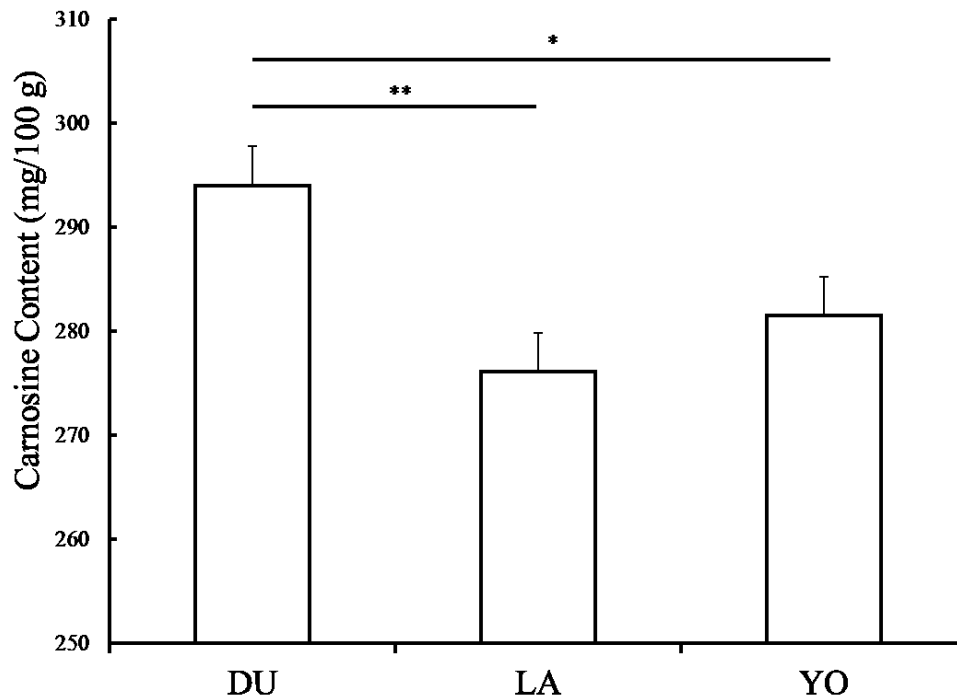
using a one-way ANOVA (3 levels; 2 levels (High and Low) for protein abundance) and means were compared using multiple comparisons with a Tukey adjustment. Since residuals were not always normally distributed, a non-parametric Kruskal-Wallis test was also conducted to corroborate significance found in the parametric analysis. Differences were declared significant at  $P \leq 0.05$  and tendencies at  $0.05 < P \leq 0.10$ .

## **2.5.4. Results and Discussion**

### **2.5.4.1. Carnosine content in the pig longissimus thoracis muscle**

In our population, there was a breed effect for carnosine content in pig skeletal muscle ( $P \leq 0.01$ ), with the highest levels of carnosine being observed in Duroc *longissimus thoracis* muscle when compared with Landrace ( $P \leq 0.01$ ) and Yorkshire ( $P \leq 0.05$ ) pigs, whereas similar levels of carnosine were found between Landrace and Yorkshire pigs (Fig. 1). The level measured was similar to those previously reported for pigs (Aristoy & Toldra, 1998; Mora, Sentandreu & Toldrá, 2008; Hipkiss, 2009) although we observed muscle carnosine concentrations to vary considerably between individuals, with observed values ranging from 216.6 to 409.7 mg/100 g tissue in the whole population. Large variations in skeletal muscle carnosine content have also been observed in different species, including in human soleus (27.5% cv) and gastrocnemius (27.6% cv) muscles (Derave, Everaert, beeckman & Baguet, 2010). The muscle fibre type, diet/ $\beta$ -alanine supplementation, age and gender have been identified as key determinants of muscle carnosine content (Harris et al., 2012). In the current study however, pigs were all barrows that were raised in a test station under similar conditions and were all slaughtered at the same liveweight (120 kg) which rule out any effect of age, gender or nutrition on observed carnosine variation. Mateescu et al., (2012) recently reported moderate heritability estimates for skeletal muscle carnosine content in Angus cattle,

thus suggesting a possible genetic background effect on muscle carnosine accretion. In this study, the pigs genetic background may account for some of the observed differences in carnosine content since three different pure breeds were used and pigs were from 16 breeding herds. Moreover, differences in muscle carnosine content were recently reported among different pig crossbreeds (Straadt, Aaslyng, & Bertram, 2014) with DDLY (Duroc boars and Landrace x Yorkshire sows) pigs having lower muscle carnosine content than ID (Black Footed Iberian boars and Duroc sows) and MD (Mangalitza boars and Duroc sows), thus suggesting a possible genetic background effect. In most species, carnosine is more abundant in type II than in type I muscle fibres (Harris et al., 2012). In the current study however, the higher carnosine content found in Duroc skeletal muscle (Fig. 1) could not be explained by differences in fibre type composition since fiber composition as immunohistologically determined showed a higher percentage of type I fibres (14.42%) in the *longissimus thoracis* muscle of Duroc, when compared with Landrace (11.87%) and Yorkshire (12.60%) pigs, while the highest percentage of total type II fibres was found in Landrace (57.12%), when compared with Duroc (54.55%) and Yorkshire (54.94%) (data not shown).



Duroc (DU, n = 85), Landrace (LA; n = 92) and Yorkshire (YO; n = 105). Analyses for the effect of breed on carnosine content were performed using a one-way ANOVA followed by all pair-wise multiple comparisons with a Tukey correction. Data are presented as means of carnosine content (mg/100 g of muscle) with their SEM. \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$

**Figure A1. Carnosine content in the *longissimus thoracis* muscle of Duroc, Landrace and Yorkshire pigs.**

#### 2.5.4.2. Expression of carnosine-related genes in the pig *longissimus thoracis* muscle

To determine which of the known or suspected carnosine-related enzymes and transporters are expressed in the porcine skeletal muscle, qPCR analyses were conducted. In the pig *longissimus thoracis* muscle, the CNDP1, SLC15A1 and SLC15A2 genes were expressed below the qPCR limits of detection (Table 3). Similar observations were made in Everaert, De Naeyer, Taes and Derave (2013) with the CNDP1, SLC15A1 and SLC15A2 genes being undetectable or barely detectable in human *gastrocnemius* and mouse *tibialis anterior*

muscles (Table 3). Based on their roles in the absorption of dipeptides (including carnosine) and tripeptides in the intestine and kidney, the SLC15A1 and SLC15A2 transporters were respectively designated as the intestinal and renal isoforms of the proton-coupled oligopeptide transporter (SLC15) family (Boldyrev, Aldini & Derave, 2013). Although these transporters have been identified in different human tissues, they are undetectable in the skeletal muscle of several mammalian species (Chen, Wong & Webb, 1999; Smith, Cl emen on & Hediger, 2013), including the pig *longissimus thoracis* muscle from the current study. The absence of CNDP1 transcript in pig *longissimus thoracis* muscle was expected as this peptidase was previously identified as a serum carnosinase, which is mainly expressed in the human liver and brain tissues and, in the rodent kidney (Boldyrev, Aldini & Derave, 2013; Teufel et al., 2003). In mouse skeletal muscle, the ABAT and HDC transcripts were abundant, whereas they were respectively low and absent in the pig *longissimus thoracis* muscle (Table 3). These two enzymes are involved in directing  $\beta$ -alanine and L-histidine to alternate metabolic pathways, namely the conversion of  $\beta$ -alanine into malonate semi-aldehyde for ABAT and, the synthesis of histamine from L-histidine for HDC (Everaert, De Naeyer, Taes & Derave, 2013). Interestingly, a significant increase in ABAT mRNA abundance was observed in the skeletal muscle of mice supplemented with  $\beta$ -alanine, whereas HDC transcripts were not affected (Everaert, De Naeyer, Taes & Derave, 2013). These results suggest a possible contribution of the ABAT enzyme in the regulation of muscle carnosine content. On the opposite, results from the current study rather suggest that the HDC and ABAT enzymes unlikely contribute to the regulation of carnosine content in pig skeletal muscle. No further work is presented in this study for the ABAT, CNDP1, SLC15A1 and SLC15A2 genes since their transcripts were undetectable or present at very low levels in the pig muscle tissue.



**Table A3. mRNA abundance of carnosine-related enzymes and transporters in human (*gastrocnemius*), mouse (*tibialis anterior*) and pig (*longissimus thoracis*) skeletal muscles.**

Gene symbols <sup>1</sup>	mRNA abundance		
	Human <sup>2</sup>	Mouse <sup>2</sup>	Pig <sup>3</sup>
ABAT		++	0(+)
CARNS1	++	+	++
CNDP1	0	0(+)	0
CNDP2	++	+	+
HDC		++	0
SLC6A6 (TauT)	++	++	+
SLC15A1 (PEPT1)	0	0	0
SLC15A2 (PEPT2)	0(+)	0(+)	0
SLC15A3 (PHT2)	0(+)	+	+
SLC15A4 (PHT1)	++	++	++
SLC36A1 (PAT1)	++	++	+

<sup>1</sup> ABAT, 4-aminobutyrate aminotransferase; CARNS1, carnosine synthase 1; CNDP1, CNDP dipeptidase 1; CNDP2, CNDP dipeptidase 2; HDC, histidine decarboxylase; SLC6A6, solute carrier family 6, member 6; SLC15A1, solute carrier family 15, member 1; SLC15A2, solute carrier family 15, member 2; SLC15A3, solute carrier family 15, member 3; SLC15A4, solute carrier family 15, member 4; SLC36A1, solute carrier family 36, member 1. Gene symbols in parentheses correspond to aliases used in Everaert, De Naeyer, Taes and Derave (2013).

<sup>2</sup> Data from Everaert, De Naeyer, Taes and Derave (2013).

<sup>3</sup> Data from current study: ++, Cycle threshold (Ct)  $\leq$  25; +, Ct between 25-27; 0(+), Ct between 27-30 and 0, Ct  $\geq$  30.

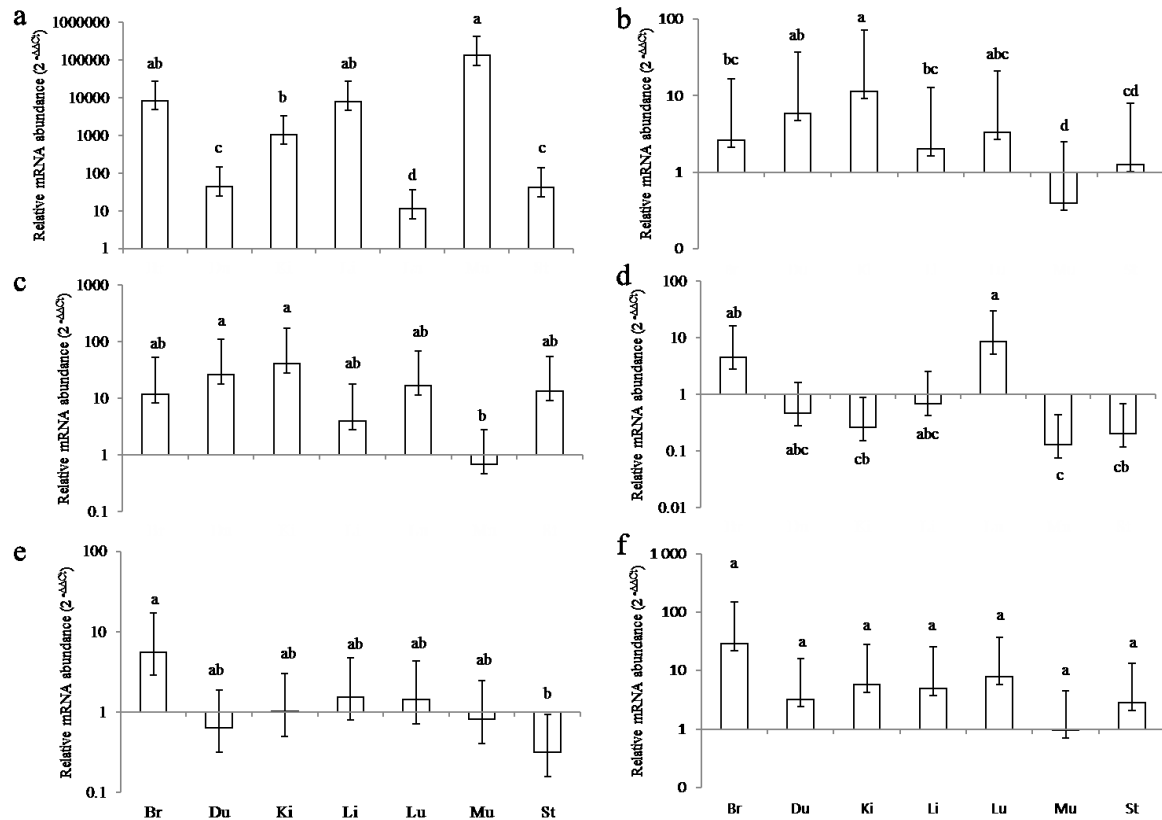
Transcripts of enzymes involved in carnosine synthesis (CARNS1) and hydrolysis (CNDP2) are expressed in the human, mouse and pig skeletal muscle (Table 3). Carnosine synthase 1 is a cytosolic ATP-dependent enzyme that synthesizes carnosine from  $\beta$ -alanine and L-histidine in the skeletal muscle and, homocarnosine from L-histidine and  $\gamma$ -aminobutyrate in brain (Drozak, Veiga-da-Cunha, Vertommen, Stroobant and Van Schaftingen, 2010). Detection of CARNS1 transcript in the pig skeletal muscle has been reported recently and its gene expression was found to follow muscle carnosine content (Yang et al., 2014). Although the CNDP2 transcript is found in the pig muscle (Table 3), it remains to be determined whether this enzyme is active under physiological conditions since the maximal activity of this

cytosolic nonspecific dipeptidase is observed at pH 9.5 (Teufel et al., 2003). In this study, the mRNA abundance of the proton-coupled L-histidine/peptides transporters SLC15A3 and SLC15A4 was also investigated. The SLC15A4 transcript is abundant in human, mouse and pig skeletal muscles, whereas the SLC15A3 transcript is found in mouse and pig muscles but is barely detectable in the human gastrocnemius muscle (Table 3). Although the presence of both transporters was confirmed in human and mouse skeletal muscles, the expression profile of SLC15A3 and SLC15A4 mRNA does not always accurately follow muscle carnosine content in mice (Everaert, De Naeyer, Taes & Derave, 2013). Therefore, the contribution of these transporters in skeletal muscle carnosine accretion remains to be determined. Transcripts for  $\beta$ -alanine transporters SLC6A6 and SLC36A1 are detected in pig, human and mouse skeletal muscles (Table 3). SLC6A6 is a  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$ -coupled carrier with high affinity for various substrates, including taurine and  $\beta$ -alanine (Liu, Lopez-Corcuera, Nelson, Mandiyan & Nelson, 1992). The SLC36A1 gene encodes for a low-affinity, high-capacity transporter that can transfer a wide range of amino acids, including  $\beta$ -alanine and taurine (Thwaites & Anderson, 2011). Earlier studies have suggested that SLC36A1 may allow the mass transfer of substrates in tissues where members of the SLC6 family transporters (ex. SLC6A6) are saturated (Thwaites & Anderson, 2011). Everaert, De Naeyer, Taes and Derave (2013) suggested that SLC6A6 (TauT) would be the main transporter of  $\beta$ -alanine in the mouse skeletal muscle, based on the observation that the SLC6A6 gene expression, but not that of SLC36A1, was upregulated with  $\beta$ -alanine supplementation. Caution must be used when comparing differences in mRNA abundance for the above mentioned genes (Table 3) as differences may also be explained by the fact that different species and muscles were used, along with different qPCR techniques.

#### 2.5.4.3. Tissue distribution of carnosine-related genes transcripts

Tissue distribution results clearly demonstrated that carnosine-related enzymes (CARNS1 and CNDP2) and transporters (SLC6A6, SLC15A3, SLC15A4 and SLC36A1) are expressed in all tested pig tissues (backfat, brain, duodenum, kidney, liver, *longissimus thoracis* muscle, lung and stomach; Fig. 2). For the CARNS1 gene (Fig. 2a), the highest mRNA abundance values were observed in the *longissimus thoracis* muscle, which was significantly different from the duodenum, kidney, lung, backfat (which was given a value of one) and stomach tissues ( $P \leq 0.05$ ). Similar results were found in mice, with the highest CARNS1 mRNA abundance values being observed in skeletal muscles, followed by the brain tissue (Miyaji, Sato, Maemura, Takahata & Morimatsu, 2012). For the CNDP2 gene (Fig. 2b), lower mRNA abundance values were observed in the pig *longissimus thoracis* muscle when compared with the brain, duodenum, kidney, liver and lung tissues ( $P \leq 0.05$ ), whereas similar mRNA abundance values were observed between backfat, *longissimus thoracis* muscle and stomach tissues (Fig. 2b). In human, the CNDP2 transcript was ubiquitously expressed, with the highest gene expression values being observed in tissues from the central nervous system and in the stomach, intestine, heart and spleen, to name a few (Teufel et al., 2003). In agreement with results from the current study, the CNDP2 transcript was weakly expressed in human skeletal muscle (Teufel et al., 2003). In skeletal muscle, the low mRNA abundance of this peptidase, along with its maximal activity at pH 9.5 (Teufel et al., 2003), may account for the slow muscle carnosine washout rate (2 to 4% per week) observed after cessation of carnosine supplementation in human (Sale et al., 2013). For the SLC6A6 transporter, similar mRNA abundance values were observed in the pig brain, duodenum, kidney, liver, lung and stomach tissues (Fig. 2c). Moreover, SLC6A6 transcript abundance was lower in pig skeletal muscle than in the duodenum and kidney ( $P \leq 0.05$ ). The SLC6A6 transcript is also ubiquitously expressed in human (Ramamoorthy et al., 1994), mouse (Liu, Lopez-Corcuera, Nelson, Mandiyan & Nelson, 1992) and rat (Smith et al., 1992) tissues and, contrasting with current findings, the skeletal muscle and placenta showed the highest SLC6A6 mRNA abundance in

human (Ramamoorthy et al., 1994). The SLC15A3 (Fig. 2d) transcript abundance was the highest in the pig lung, which differed significantly from the kidney, skeletal muscle and stomach tissues ( $P \leq 0.05$ ). Similar SLC15A3 mRNA abundance values were observed in the backfat, duodenum, kidney, liver, skeletal muscle and stomach (Fig. 2d). In a previous study, the SLC15A3 transcript was reported to be abundant in the rat lung, spleen and thymus, barely detectable in the brain, liver and heart and undetectable in the kidney, duodenum and muscle tissues (Sakata et al., 2001). In this study, similar SLC15A4 mRNA abundance was observed in the brain, duodenum, kidney, liver, lung, skeletal muscle and backfat and, there was a significant difference in transcript abundance between the brain and stomach tissues (Fig. 2e,  $P \leq 0.05$ ). A different expression pattern was earlier reported in rats, with an abundant expression of the SLC15A4 transcript found in brain and eye tissues and a faint or undetectable expression in the kidney, intestine, liver, lung and skeletal muscle (Yamashita et al., 1997). In human, the SLC36A1 transcript was found in several tissues and its expression was highest in the intestine (Chen et al., 2003) or the brain (Bermingham & Pennington, 2004). There was no significant difference among tissues for the SLC36A1 gene (Fig. 2f), even though transcript abundance was numerically higher in the pig brain. Collectively, tissue distribution analyses from previous and current studies clearly show that CARNIS1, CNBP2, SLC6A6, SLC15A3, SLC15A4 and SLC36A1 transcripts are ubiquitously expressed. Discrepancies among studies may be due to species-specific differences or to different techniques being used when measuring transcript abundance.

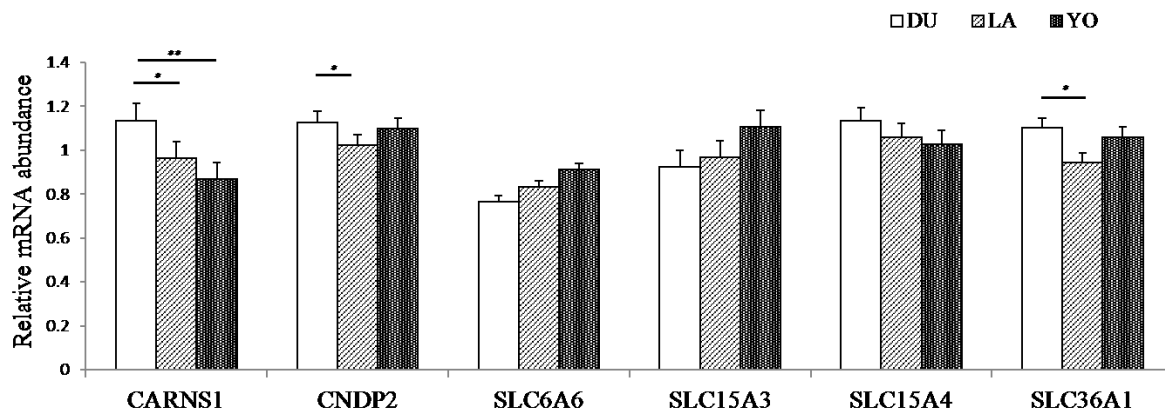


(a) CARNS1, (b) CNDP2, (c) SLC6A6, (d) SLC15A3, (e) SLC15A4 and (f) SLC36A1 genes in the brain (Br), duodenum (Du), kidney (Ki), liver (Li), lung (Lu), *longissimus thoracis* muscle (Mu), and stomach (St). Results are presented as fold-over values relative to the backfat tissue sample, which was given a value of one. The q-PCR analyses were performed in triplicate using RPL32 as the reference gene. Three (n = 3) crossbred sows (Duroc x Yorkshire-Landrace) were used for each tissue. Unlike letters differ at  $P \leq 0.05$ .

**Figure A2. Relative mRNA abundance of CARNS1, CNDP2, SLC6A6, SLC15A3, SLC15A4 and SLC36A1 genes in the brain, duodenum, kidney, liver, lung, *longissimus thoracis* muscle, and stomach.**

#### **2.5.4.4. Carnosine-related gene mRNA abundance in the skeletal muscle of different pig breeds and muscle carnosine content**

The relative mRNA abundance of carnosine-related genes in the pig *longissimus thoracis* muscle was compared among studied breeds (Fig. 3). An overall breed effect was observed for the transcript abundance of CARNS1 ( $P < 0.001$ ), CNDP2 ( $P \leq 0.05$ ) and SLC36A1 ( $P \leq 0.05$ ) genes, whereas the SLC6A6, SLC15A3 and SLC15A4 mRNA abundance was similar among breeds. Using all pair-wise multiple comparisons analyses, we then observed a higher CARNS1 mRNA abundance in the *longissimus thoracis* muscle of Duroc compared with Landrace ( $P \leq 0.05$ ) and Yorkshire ( $P \leq 0.01$ ), whereas there was no difference between Landrace and Yorkshire ( $P > 0.10$ ) pigs. These results, along with the higher muscle carnosine content found in Duroc (Fig. 1), suggest that this breed has a greater capacity to accumulate carnosine in skeletal muscle. A similar observation was made in Everaert, De Naeyer, Taes and Derave (2013), where mice supplemented with dietary  $\beta$ -alanine showed an increase in muscle carnosine content, which was paralleled with higher CARNS1 (tendency) and CNDP2 mRNA abundance. The greater CNDP2 mRNA abundance observed in Duroc pigs might reflect the activation of a feedback inhibition process to prevent excess carnosine accumulation. However, this remains to be determined as carnosine hydrolysis by muscle CNDP2 has been suggested to be minimal based on its maximal activity at pH 9.5 (Teufel et al., 2003). Duroc pigs also had higher mRNA abundance values for the SLC36A1 genes when compared with Landrace ( $P \leq 0.05$ ). This may reflect a better transfer of carnosine precursors in that breed since this transporter is known to allow  $\beta$ -alanine transport (Thwaites & Anderson, 2011). However, this remains to be determined in pigs, as the SLC36A1 mRNA abundance was not affected by  $\beta$ -alanine supplementation in mice skeletal muscle (Everaert, De Naeyer, Taes & Derave, 2013).



Values are means with their respective SEM. CARNS1, carnosine synthase 1; CNDP2, CNDP dipeptidase 2; SLC6A6, solute carrier family 6, member 6; SLC15A3 et SLC15A4, solute carrier family 15, member 3 et 4; SLC36A1, solute carrier family 36, member 1 genes in the *longissimus thoracis* muscle of Duroc (DU; n = 85), Landrace (LA, n = 92) and Yorkshire (YO; n = 105) pigs. The q-PCR analyses were performed in triplicate with TOP2B, Topoisomerase (DNA) II beta as reference gene. \*  $P \leq 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$ .

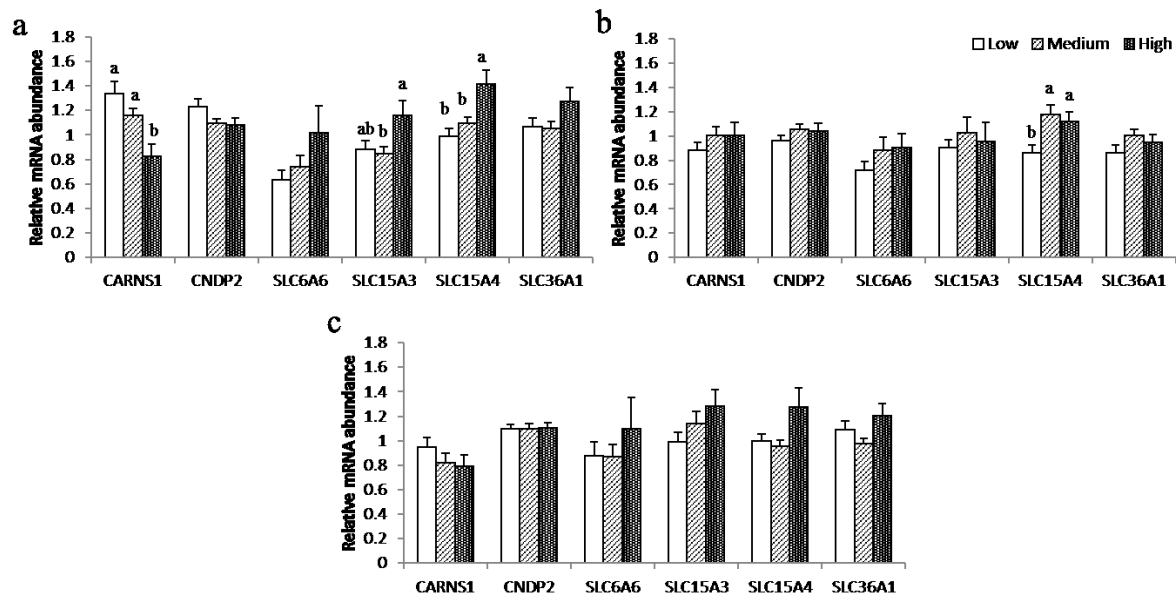
**Figure A3. Relative mRNA abundance of carnosine-related genes in the *longissimus thoracis* muscle of Duroc, Landrace and Yorkshire pigs.**

The mRNA abundance of carnosine-related genes in the *longissimus thoracis* muscle of pigs with different levels of muscle carnosine (Low, Medium and High) within breed is shown in Fig. 4 and, carnosine content values within each group presented in Table 4. In Duroc pigs, there was a carnosine content group effect for CARNS1 ( $P = 0.001$ ), SLC15A3 (tendency,  $P = 0.06$ ) and SLC15A4 ( $P \leq 0.01$ ). In this breed, pigs with high muscle carnosine content (High group) had lower CARNS1 mRNA abundance values when compared with those in the Low or Medium groups ( $P \leq 0.05$ ; Fig. 4a). A decrease in CARNS1 mRNA abundance in Duroc pigs with high muscle carnosine content was not expected since this enzyme is involved in carnosine synthesis. However, a similar observation was made in mice (Everaert, De Naeyer, Taes & Derave, 2013), with lower carnosine synthase mRNA abundance in conditions of increased muscle carnosine content (e.g. when testosterone is injected to castrated rats) and, on the opposite, higher CARNS1 mRNA abundance with decreased

muscle carnosine content (e.g. after orchidectomy). On the opposite, CARNS1 transcript abundance in the pig skeletal muscle was found to follow muscle carnosine content (Yang et al., 2014). One possible explanation may be that carnosine could act as a competitive inhibitor of its own synthesis. Indeed, carnosine was found to be a competitive inhibitor of  $\beta$ -alanine at the active site of the human carnosine synthase, with  $K_i$  values of 14.8 mM, a concentration that lies within the range of carnosine content in human skeletal muscle (Drozak, Van Schaftingen & Veiga-Da-Cunha, 2015). Interestingly, the CARNS1 transcript abundance and muscle carnosine content are both increased when mice are supplemented with  $\beta$ -alanine (Everaert, De Naeyer, Taes & Derave, 2013), thus suggesting that high intracellular concentrations of  $\beta$ -alanine would favor carnosine synthesis. The higher carnosine concentration observed in the Duroc High group (354.47 mg/100 g), when compared with those found in Landrace High (322.47 mg/100 g) and Yorkshire High (333.64 mg/100 g) pigs (Table 4), may be one of the reason why a significant difference in CARNS1 mRNA abundance, among groups of carnosine content, is only observed in Duroc pigs. Indeed, it may take a certain carnosine content threshold, which was possibly reached in Duroc pigs (High group), before being able to see a carnosine inhibitory effect on muscle CARNS1 mRNA abundance. Duroc pigs in the High muscle carnosine content group had the highest SLC15A3 (High vs Medium,  $P \leq 0.05$ ) and SLC15A4 (High vs Low,  $P \leq 0.05$ ; High vs Medium,  $P \leq 0.05$ ) mRNA abundance values (Fig. 4a). A similar expression pattern was observed in Landrace pigs for SLC15A4, with lower mRNA abundance values being observed in animals with low carnosine content (Low group) when compared with those of the Medium and High group ( $P \leq 0.05$ ; Fig. 4b). These results suggest that, in conditions of high muscle carnosine content, this dipeptide might upregulate the transcription of SLC15A3 and SLC15A4 transporters. However, the real contribution of the SLC15A3 and SLC15A4 transporters in carnosine metabolism remains to be determined as Everaert, De Naeyer, Taes and Derave (2013) recently reported that their gene expression did not always follow changes in muscle carnosine content in mice skeletal muscle. Results from this study suggest a limited contribution of the CNDP2, SLC6A6 and SLC36A1 genes to muscle carnosine metabolisms



since there was no significant difference in their mRNA abundance among carnosine content groups in either Duroc, Landrace or Yorkshire pigs (Fig. 4).



Analyses were performed for Duroc (a), Landrace (b) and Yorkshire (c) pigs. Data represent mean values with SEM. The number of pigs within each carnosine content group was: Duroc (23 Low, 44 Medium and 18 High); Landrace (30 Low, 39 Medium and 23 High); Yorkshire (40 Low, 47 Medium and 18 High). The selection of animals for each carnosine category was performed with the FASTCLUS procedure of SAS, followed by the DISCRIM procedure. CARNS1, carnosine synthase 1; CNDP 2, CNDP dipeptidase 2; SLC6A6, solute carrier family 6, member 6; SLC15A3 and SLC15A4, solute carrier family 15, member 3 and 4; SLC36A1, solute carrier family 36, member 1. The q-PCR analyses were performed in triplicate with TOP2B, Topoisomerase (DNA) II beta as reference gene. Mean values with different lower case letters are significantly different at  $P \leq 0.05$ .

**Figure A4. Relative mRNA abundance of carnosine-related genes in the *longissimus thoracis* muscle of pigs within the Low, Medium and High based on muscle carnosine content for Duroc, Landrace and Yorkshire pigs.**

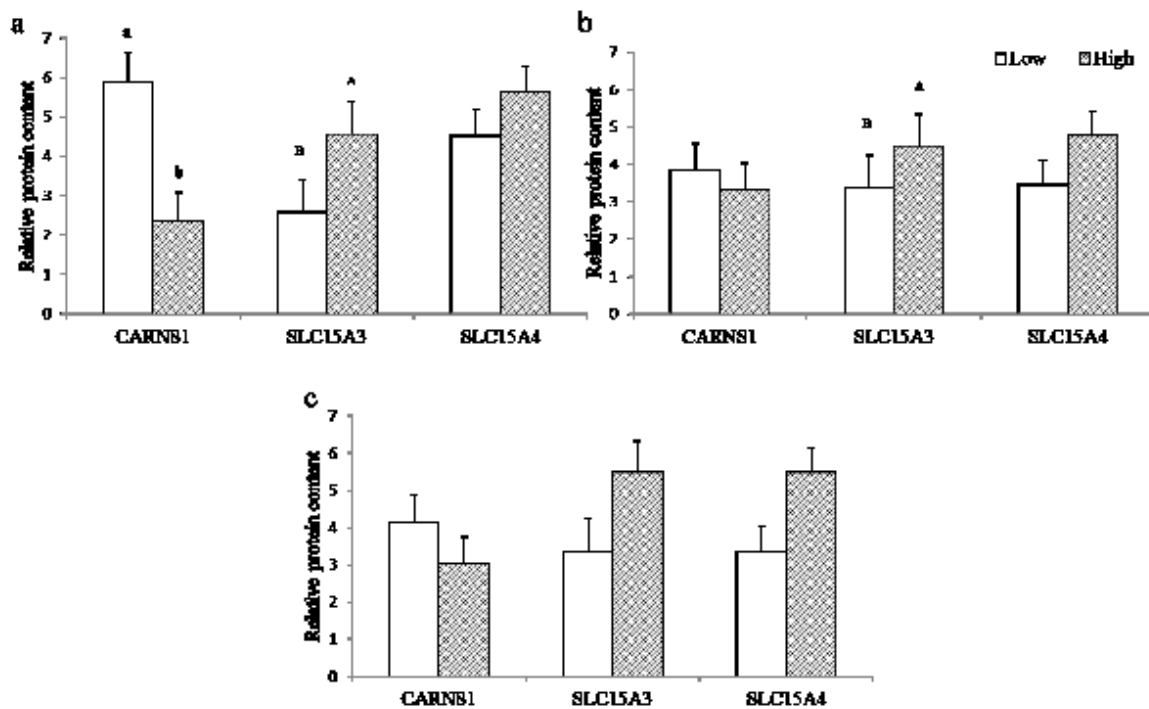
**Table A4. Meat quality parameters in the *longissimus thoracis* muscle of Low, Medium and High groups of muscle carnosine content within Duroc, Landrace and Yorkshire breed pigs.**

	Duroc				Landrace				Yorkshire					
	Low n = 23	Medium n = 44	High n = 18	SEM	P-value	Low n = 30	Medium n = 39	High n = 23	SEM	P-value	Low n = 40	Medium n = 47	High n = 18	SEM
Carnosine content (mg/100g)	246.84 <sup>c</sup>	294.34 <sup>b</sup>	353.47 <sup>a</sup>	4.49	< 0.001	242.91 <sup>c</sup>	274.21 <sup>b</sup>	322.47 <sup>a</sup>	4.57	< 0.001	254.05 <sup>c</sup>	284.83 <sup>b</sup>	333.64 <sup>a</sup>	4.11
Meat color <sup>1</sup>														
Color a*	4.46	4.47	4.16	0.21	0.48	4.39	4.12	4.59	0.21	0.27	4.80 <sup>a</sup>	4.89 <sup>a</sup>	5.35 <sup>a</sup>	0.19
Color b*	7.06 <sup>a</sup>	6.73 <sup>a</sup>	5.80 <sup>b</sup>	0.30	0.01	7.30 <sup>a</sup>	6.90 <sup>a</sup>	6.69 <sup>a</sup>	0.26	0.09	7.03	6.97	7.14	0.20
Color L*	53.51 <sup>a</sup>	52.27 <sup>a</sup>	48.41 <sup>b</sup>	0.87	< 0.001	54.42 <sup>a</sup>	53.29 <sup>a</sup>	52.60 <sup>a</sup>	0.71	0.05	52.98	52.33	52.07	0.61
Japanese visual color score	3.22 <sup>b</sup>	3.34 <sup>b</sup>	4.00 <sup>a</sup>	0.11	< 0.001	3.03 <sup>b</sup>	3.14 <sup>b</sup>	3.42 <sup>a</sup>	0.10	0.01	3.20 <sup>a</sup>	3.36 <sup>a</sup>	3.47 <sup>a</sup>	0.10
Water holding capacity														
Cooking loss (%)	17.96 <sup>ab</sup>	18.76 <sup>a</sup>	15.90 <sup>b</sup>	0.82	0.01	18.87	19.15	18.51	0.33	0.36	18.83	18.94	18.10	0.36
Drip loss (%)	3.71 <sup>a</sup>	3.23 <sup>a</sup>	2.01 <sup>a</sup>	0.58	0.08	3.74	3.91	3.96	0.59	0.92	4.53 <sup>a</sup>	3.59 <sup>ab</sup>	2.97 <sup>b</sup>	0.39
Freezing loss (%)	9.83 <sup>a</sup>	9.71 <sup>a</sup>	7.14 <sup>b</sup>	0.58	< 0.001	9.59	9.70	9.30	0.49	0.78	9.88 <sup>a</sup>	9.40 <sup>a</sup>	8.75 <sup>a</sup>	0.40
Physical and chemical traits <sup>2</sup>														
Fat content (%)	5.97	5.89	5.44	0.27	0.31	5.17	5.27	5.26	0.26	0.93	5.02	5.16	5.50	0.23
Marbling score NPPC	3.17	3.22	3.40	0.18	0.61	2.01	2.08	2.24	0.14	0.45	2.19 <sup>b</sup>	2.46 <sup>ab</sup>	2.72 <sup>a</sup>	0.13
Moisture content (%)	72.26	72.04	72.08	0.28	0.75	72.68	72.47	72.75	0.28	0.60	72.62	72.68	72.49	0.32
MFI	147.09	140.25	129.69	10.49	0.32	141.62	154.68	148.79	6.61	0.31	147.26	146.94	148.47	5.85
pH 24 h	5.63 <sup>b</sup>	5.64 <sup>b</sup>	5.86 <sup>a</sup>	0.07	0.01	5.55 <sup>b</sup>	5.57 <sup>ab</sup>	5.63 <sup>a</sup>	0.03	0.03	5.57 <sup>b</sup>	5.59 <sup>ab</sup>	5.66 <sup>a</sup>	0.03
Protein content (%)	21.36 <sup>c</sup>	21.86 <sup>b</sup>	22.25 <sup>a</sup>	0.15	< 0.001	22.12	22.37	22.32	0.14	0.37	22.42	22.45	22.21	0.11
Shear force (N)	21.80 <sup>b</sup>	25.22 <sup>ab</sup>	27.65 <sup>a</sup>	1.67	0.02	27.02 <sup>a</sup>	26.95 <sup>a</sup>	30.76 <sup>a</sup>	1.41	0.06	27.01 <sup>a</sup>	29.20 <sup>a</sup>	27.57 <sup>a</sup>	1.09
Glycolytic and oxidative metabolism indicators <sup>3</sup>														
Citrate synthase	7.22	7.04	7.22	0.24	0.74	6.73	6.42	6.71	0.27	0.31	6.55	6.75	7.00	0.18
Glycolytic potential	189.70 <sup>a</sup>	157.33 <sup>b</sup>	134.94 <sup>c</sup>	8.78	< 0.001	171.72 <sup>a</sup>	163.67 <sup>a</sup>	158.09 <sup>a</sup>	4.63	0.05	167.08 <sup>a</sup>	156.28 <sup>ab</sup>	147.33 <sup>b</sup>	5.65
LDH	2152.58	2241.68	2297.40	66.98	0.18	2203.67	2228.08	2289.11	52.22	0.47	2321.66	2353.55	2442.42	46.82
Malic enzyme	231.81	231.27	264.11	18.68	0.28	229.80	202.88	207.97	14.23	0.30	220.78 <sup>a</sup>	243.88 <sup>a</sup>	261.95 <sup>a</sup>	14.17

Data represent mean values of the Low, Medium and High groups of skeletal muscle carnosine content with the standard error of the mean (SEM); Different letters within row differ within a breed at  $P \leq 0.05$  (Tukey test).  
<sup>1</sup>Color a\*, b\* and L\* are estimated with a Minolta Chroma Meter CR-300 colorimeter; The Japanese color score is estimated based on a scale of 1 (pale) to 6 (dark).  
<sup>2</sup>The NPPC marbling score is based on a scale of 1 (devoid) to 10 (abundant); MFI, Myofibrillar fragmentation Index (scale of 0 to 100).  
<sup>3</sup>Citrate synthase (IU/g tissue); Glycolytic potential (μmol of lactate eq/g tissue); LDH, Lactate dehydrogenase (IU/g tissue); Malic enzyme (μmoles NADPH\*min<sup>-1</sup>\*g<sup>-1</sup>)

#### **2.5.4.5. Muscle CARNS1, SLC15A3 and SLC15A4 protein abundance in pigs with different muscle carnosine content**

Slot blot analyses were performed to validate, at the protein level, the observed differences in CARNS1, SLC15A3 and SLC15A4 mRNA abundance between Low and High carnosine content groups. For the first time, strong positive correlations are reported between mRNA and protein abundance values for CARNS1 ( $r = 0.98$ ,  $P < 0.0001$ ), SLC15A3 ( $r = 0.96$ ,  $P < 0.0001$ ) and SLC15A4 ( $r = 0.96$ ,  $P < 0.0001$ ) in skeletal muscle. Protein abundance of CARNS1, SLC15A3 and SLC15A4 in the *longissimus thoracis* muscle of animals with Low or High muscle carnosine content within breed is shown in Fig. 5. In agreement with gene expression results (Fig. 4a), Duroc pigs with higher muscle carnosine content had lower CARNS1 ( $P \leq 0.05$ ) and higher SLC15A3 (tendency,  $P = 0.10$ ) protein abundance values when compared with the Low carnosine content group (Fig. 5a). In Landrace pigs, the SLC15A3 protein abundance was higher in the High carnosine content group than in the Low group (tendency  $P = 0.09$ ; Fig 5b), whereas the SLC15A3 mRNA abundance was similar between Low and High carnosine content groups (Fig. 4b). In Duroc and Landrace pigs, differences observed between Low and High carnosine content groups for the SLC15A4 mRNA abundance (Fig. 4a and b) could not be validated at the protein level. Discrepancies between protein (Fig. 5) and mRNA (Fig. 4) expression profiles are probably due to the low number of animals within Low ( $n = 10$ ) and High ( $n = 10$ ) carnosine content groups that were used in slot blot analyses.



Duroc (a), Landrace (b) and Yorkshire (c) pigs. Data represent relative protein content values (µg of protein) with SEM. The number of pigs within each carnosine content group was the same for each breed (10 Low and 10 High). CARNS1, carnosine synthase 1; SLC15A3 and SLC15A4, solute carrier family 15, member 3 and 4. Slot blot analyses were performed for Duroc, Landrace and Yorkshire pigs. Mean values with different lower case letters are significantly different at  $P \leq 0.05$  and those with different upper case letters tend to be different at  $0.05 < P \leq 0.10$

**Figure A5. Relative content of CARNS1, SLC15A3 and SLC15A4 proteins in the longissimus thoracis muscle of pigs within the Low and High groups of muscle carnosine content.**

#### 2.5.4.6. Muscle carnosine content and longissimus thoracis meat quality attributes

In this study, the relationship between muscle carnosine content and pork meat quality parameters was investigated (Table 4). Carnosine content group effects were found for color  $b^*$  (Duroc,  $P = 0.01$ ; Landrace, tendency  $P = 0.09$ ), color  $L^*$  (Duroc,  $P < 0.001$ ; Landrace,  $P$

$\leq 0.05$ ), Japanese visual color score (Duroc,  $P < 0.001$ ; Landrace,  $P = 0.01$ ; Yorkshire,  $P \leq 0.05$ ), cooking loss (Duroc,  $P = 0.01$ ), drip loss (Duroc, tendency  $P = 0.08$ ; Yorkshire,  $P = 0.01$ ), freezing loss (Duroc,  $P < 0.001$ ; Yorkshire, tendency  $P = 0.07$ ) and pH 24h (Duroc,  $P = 0.01$ ; Landrace,  $P \leq 0.05$ ; Yorkshire,  $P \leq 0.05$ ) values. Previous studies have reported that the rate and extent of post-mortem pH decline significantly affect sarcoplasmic and myofibrillar protein characteristics, which in turn are closely related with pork meat color and water holding capacity (Scheffler & Gerrard, 2007). The proton-sequestering property of the carnosine imidazole ring confers a high buffering capacity to this histidine containing dipeptide, with  $pK_a$  values close to 7.0 (Boldyrev, Aldini & Derave, 2013). We may thus hypothesize that high muscle carnosine concentrations would help in reducing the post-mortem pH drop and would thus contribute in improving meat color and water holding capacity. Indeed, pigs with High muscle carnosine content in our study showed higher ultimate pH (High > Low and Medium in Duroc; High > Low in Landrace and Yorkshire) and Japanese visual color score (High > Low and Medium in Duroc and Landrace) values, along with lower values of meat color  $b^*$  (High < Low and Medium in Duroc) and  $L^*$  (High < Low and Medium in Duroc), when compared with the Low and Medium groups (Table 4). Muscle carnosine content may also affect water holding capacity parameters as demonstrated by lower drip loss (High < Low in Yorkshire), cooking loss (High < Medium in Duroc) and freezing loss (High < Low and Medium in Duroc) values in pigs with high muscle carnosine content. Ma, Jiang, Lin, Zheng and Zhou (2010) investigated the effect of dietary carnosine supplementation on pork meat quality and observed higher post-mortem pH 45 min, 24 h and 48 h, along with lower drip loss at 48 h (but not at 24 h) and, higher color  $a^*$  values in the *longissimus thoracis* muscle of pigs fed with 100 mg carnosine/kg feed compared with those fed 0 or 25 mg/kg. However, these authors did not measure muscle carnosine content and, could not establish a clear link between muscle carnosine content and meat quality attributes.

In this study, there was a carnosine content group effect for shear force (Duroc,  $P \leq 0.05$ ; Landrace and Yorkshire, tendencies  $P = 0.06$ ) and glycolytic potential (Duroc, Landrace and

Yorkshire  $P \leq 0.05$ ) values (Table 4). Lower glycolytic potential values were found in the High carnosine content group when compared with pigs from the Low and/or Medium groups (High < Medium < Low in Duroc; High < Low in Yorkshire). It was earlier reported that pork quality attributes are greatly influenced by the post-mortem anaerobic glycolysis that produces lactate, which accumulates and contributes to the intracellular drop in pH (Monin & Sellier, 1985; Ryu, Choi & Kim, 2005). Moreover, negative phenotypic and genetic correlations were reported between the ultimate pH and glycolytic potential values in various pig muscles (Larzul, Le Roy, Monin & Sellier, 1998). Therefore, the lower glycolytic potential values found in the High carnosine content group may be associated with the higher ultimate pH values observed for these pigs (Table 4). However, it is unclear at the present time why pigs from the High carnosine content group had the lowest glycolytic potential values. According to Manhiani, Nothcutt, Bridges & Dawson (2011), carnosine content was reported to increase ten times in breast and thigh of broilers following short term pre-slaughter stress. Although no definitive explanation was provided by the authors, this may be one possibility to reconcile the lowest glycolytic potential measured in our High carnosine group of pigs although no assessment of pre-slaughter stress was done in our study. Another possibility may be linked with the carnosine ability to chelate metal ions (Boldyrev, Aldini & Derave, 2013), some of which are known to regulate glycolytic enzyme activities in skeletal muscle (Takami, Ikeda & Funatsuka, 1983; Garfinkel & Garfinkel, 1985).

The effect of carnosine on intracellular calcium release (Zaloga et al., 1997) and on the activity of calcium-dependent calpains (Johnson & Hammer, 1989) suggests that this dipeptide may affect meat tenderness. In the current study, shear force values were higher in Duroc pigs having High muscle carnosine content when compared with those in the Low group ( $P \leq 0.05$ ) and, although an overall carnosine content group effect was observed for shear force values in Landrace and Yorkshire pigs (tendencies,  $P = 0.06$ ), differences between carnosine content groups were not significant for these breeds. A weak phenotypic correlation (0.139) has been observed between Warner-Bratzler shear force values and *longissimus*

muscle carnosine content in Angus cattle, along with a negative association of overall tenderness, as assessed by a trained panel, with muscle carnosine content (Mateescu et al., 2012). In contrast, supplementing pigs with different levels of carnosine had no effect on meat tenderness (Ma, Jiang, Lin, Zheng, & Zhou, 2010), whereas in broiler chickens, dietary carnosine decreased shear force values in thigh and breast muscles (Hu et al., 2009). Collectively, current and previous studies do not provide a clear answer for the possible implication of muscle carnosine in pork meat tenderness. Moreover, reported differences in shear forces in our study are unlikely to be significant for consumers.

Finally, carnosine content group effects were also found for meat color  $a^*$  (tendency,  $P = 0.08$ ), marbling score NPPC ( $P = 0.01$ ) and malic enzyme activity ( $P = 0.05$ ) parameters, but these effects were only observable in Yorkshire pigs (Table 4). In this breed, the highest marbling score (NPPC) and malic enzyme activity values were found in pigs with high muscle carnosine content. These results contrast with those of Ma, Jiang, Lin, Zheng and Zhou (2010), as dietary carnosine supplementation had no effect on pig *longissimus thoracis* marbling values. Moreover, carnosine was found to decrease malic enzyme gene expression and activity in the liver of high fat diet mice, but had no effect in controlled diet mice (Mong, Chao and Yin, 2011). Thus, the above results, along with the fact that there was no carnosine content group effect on muscle fat content for the three studied breeds (Table 4), suggest a quite limited role for muscle carnosine on muscle fat accretion.

### **2.5.5. Conclusions**

This study reports, for the first time, the presence of carnosine-related enzymes (CARNS1 and CNDP2) and transporters (SLC6A6, SLC15A3, SLC15A4 and SLC36A1) transcripts in the pig skeletal muscle and in several pig tissues. Muscle carnosine content and carnosine-

related gene mRNA abundance were modulated according to pig breeds, thus identifying the pig genetic background as a potential determinant in the regulation of muscle carnosine content. Moreover, the lower CARNS1 mRNA abundance found in skeletal muscle of Duroc pigs with high carnosine content suggest a possible retro control effect of carnosine on CARNS1 transcription and, a specific carnosine content threshold may be needed for such effect as this was only observed in Duroc pigs, the breed with the highest muscle carnosine content values. Furthermore, our results clearly show that pigs with higher muscle carnosine content present improved meat quality attributes such as increased pH 24h values, better water holding capacity and decreased meat yellowness (b\*) and lightness (L\*). Parameters other than muscle carnosine content may have also affected studied meat quality attributes. Further studies to determine the effect of dietary  $\beta$ -alanine or carnosine supplementation on pork meat quality attributes may provide additional information on the direct link between muscle carnosine and meat quality parameters. Studies are also needed to determine if other, yet unidentified, carnosine-related enzymes and transporters might be involved in the regulation of pig muscle carnosine content.

#### **2.5.6. Acknowledgements**

This work was financially supported by Agriculture and Agri-Food Canada, Swine Innovation Porc, Canada Pork International, Canadian Pork Council, le Centre de Développement du Porc du Québec and the Canadian Centre for Swine Improvement (Grant number J-000383). The authors want to thank Danièle Beaudry for technical assistance, Steve Methot for his help with statistical analyses, technicians from the Deschambault test station for animal care and collection of data and, Aliments ASTA Inc. (Saint-Alexandre-de-Kamouraska, QC, Canada) for their invaluable help with tissue collection.



## 2.5.7. References

- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, *64*, 5245-5250.
- AOAC (2007). *Official methods of analysis* (18<sup>th</sup> ed.). Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Applied Biosystems (1997). *User Bulletin #2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System*. Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.
- Aristoy, M. C., & Toldrá, F. (1998). Concentration of free amino acids and dipeptides in porcine skeletal muscles with different oxidative patterns. *Meat Science*, *50*, 327-332.
- Bass, A., Brdiczka, D., Eyer, P., Hofer, S., & Pette, D. (1969). Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *European Journal of Biochemistry*, *10*, 198-206.
- Berg, E. P. (2006). Pork composition and quality assessment procedures. *National Pork Producers Council (NPPC)*, Des Moines, IA, USA.
- Bermingham, J. R., & Pennington, J. (2004). Organization and expression of the SLC36 cluster of amino acid transporter genes. *Mammalian Genome*, *15*, 114-125.
- Boldyrev, A. A., Aldini, G., & Derave, W. (2013). Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiological reviews*, *93*, 1803-1845.
- Canadian Council on Animal Care Guidelines (CCAC) (2009). The care and use of farm animals in research, teaching and testing, CCAC, Ottawa, Ontario, Canada.
- Chan, W. K., Decker, E. A., Chow, C. K., & Boissonneault, G. A. (1994). Effect of dietary carnosine on plasma and tissue antioxidant concentrations and on lipid oxidation in rat skeletal muscle. *Lipids*, *29*, 461-466.
- Chen, H., Wong, E. A., & Webb, K. E. (1999). Tissue distribution of a peptide transporter mRNA in sheep, dairy cows, pigs, and chickens. *Journal of Animal Science*, *77*, 1277-1283.

- Chen, Z., Fei, Y. J., Anderson, C. M., Wake, K. A., Miyauchi, S., Huang, W., et al. (2003). Structure, function and immunolocalization of a proton-coupled amino acid transporter (hPAT1) in the human intestinal cell line Caco-2. *Journal of Physiology*, *546*(Pt 2), 349-361.
- Cheng, J. H., Wang, S. T., & Ockerman, H. W. (2013). Quality preservation of reduced sodium pork patties: effects of antioxidants on colour and lipid stability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *93*, 2959-2962.
- Culbertson, J. Y., Kreider, R. B., Greenwood, M., & Cooke, M. (2010). Effects of beta-alanine on muscle carnosine and exercise performance: a review of the current literature. *Nutrients*, *2*, 75-98.
- Derave, W., Everaert, I., Beeckman, S., & Baguet, A. (2010). Muscle carnosine metabolism and  $\beta$ -alanine supplementation in relation to exercise and training. *Sports Medicine*, *40*, 247-263.
- Drozak, J., Veiga-da-Cunha, M., Vertommen, D., Stroobant V., & Van Schaftingen, E. (2010). Molecular identification of carnosine synthase as ATP-grasp domain-containing protein 1 (ATPGD1). *Journal of Biological Chemistry*, *285*, 9346-9356.
- Drozak, J., Van Schaftingen, E., & Veiga-Da-Cunha, M. (2015) Chapter 6: The Biochemistry of enzymes producing carnosine and anserine. In V. R. Preddy (Eds.), *Food and Nutritional Components in Focus; Imidazole Dipeptides: Chemistry, Analysis Function and Effects* (pp. 99- 117). The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Cambridge, UK.
- Dunnett, M., & Harris, R. C. (1999). Influence of oral  $\beta$ -alanine and L-histidine supplementation on the carnosine content of the *gluteus medius*. *Equine veterinary journal*, *31*(S30), 499-504.
- Everaert, I., De Naeyer, H., Taes, Y., & Derave, W. (2013). Gene expression of carnosine-related enzymes and transporters in skeletal muscle. *European Journal of Applied Physiology*, *113*, 1169-1179.
- Farmer, C., Palin, M. F., & Martel-Kennes, Y. (2012). Impact of diet deprivation and subsequent over-allowance during prepuberty. Part 2. Effects on mammary gland

- development and lactation performance of sows. *Journal of animal science*, 90(3), 872-880.
- Garfinkel, L., & Garfinkel, D. (1985). Magnesium regulation of the glycolytic pathway and the enzymes involved. *Magnesium*, 4, 60-72.
- Harris, R. C., Wise, J. A., Price, K. A., Kim, H. J., Kim, C. K., & Sale, C. (2012). Determinants of muscle carnosine content. *Amino Acids*, 43, 5-12.
- Hipkiss, A. R. (2009). Carnosine and its possible roles in nutrition and health. *Advances in Food and Nutrition Research*, 57, 87-154.
- Hsu, R. Y., & Lardy, H. A. (1969). Malic enzyme. *Methods in enzymology*, 13, 230-235.
- Hu, X., Hongtrakul, K., Ji, C., Ma, Q., Guan, S., Song, C., et al. (2009). Effect of carnosine on growth performance, carcass characteristics, meat quality and oxidative stability in broiler chickens. *Journal of Poultry Science*, 46, 296-302.
- Johnson, P., & Hammer, J. L. (1989). Effects of L-1-methyl-histidine and the muscle dipeptides carnosine and anserine on the activities of muscle calpains. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 94b, 45-48.
- Labrecque, B., Beaudry, D., Mayhue, M., Hallé, C., Bordignon, V., Murphy, B. D., et al. (2009). Molecular characterization and expression analysis of the porcine paraoxonase 3 (PON3) gene. *Gene*, 443, 110-120.
- Larzul, C., Le Roy, P., Monin, G., & Sellier, P. (1998). Variabilité génétique du potentiel glycolytique du muscle chez le porc. *INRA Productions Animales*, 11, 183-197.
- Lefaucheur, L., Ecolan, P., Plantard, L., & Gueguen, N. (2002). New insights into muscle fiber types in the pig. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 50, 719-730.
- Leveille, G. A., & Hanson, R. W. (1966). Adaptive changes in enzyme activity and metabolic pathways in adipose tissue from meal-fed rats. *Journal of Lipid Research*, 7, 46-55.
- Li, H., Gariépy, C., Jin, Y., Font i Furnols, M., Fortin, J., Rocha, L.M., et al. (2015). Effects of ractopamine administration and castration method on muscle fiber characteristics and sensory quality of the *longissimus* muscle in two Piétrain pig genotypes. *Meat Science*, 102, 27-34.

- Liu, Q. R., Lopez-Corcuera, B., Nelson, H., Mandiyan, S., & Nelson, N. (1992). Cloning and expression of a cDNA encoding the transporter of taurine and  $\beta$ -alanine in mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 89, 12145-12149.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2(-\Delta\Delta C(T))$  method. *Methods*, 25, 402-408.
- Ma, X. Y., Jiang, Z. Y., Lin, Y. C., Zheng, C. T., & Zhou, G. L. (2010). Dietary supplementation with carnosine improves antioxidant capacity and meat quality of finishing pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94, e286-e295.
- Manhiani, P. S., Northcutt, J.K., Han, I., Bridges, W.C., Scott, T.R., & Dawson, P.L. (2011). Effect of stress on carnosine levels in brain, breast, and thigh of broilers. *Poultry Science*, 90, 2348-2354.
- Mateescu, R. G., Garmyn, A. J., O'neil, M. A., Tait, R. G., Abuzaid, A., Mayes, M. S., et al. (2012). Genetic parameters for carnitine, creatine, creatinine, carnosine, and anserine concentration in longissimus muscle and their association with palatability traits in Angus cattle. *Journal of animal science*, 90, 4248-4255.
- Miyaji, T., Sato, M., Maemura, H., Takahata, Y., & Morimatsu, F. (2012). Expression profiles of carnosine synthesis-related genes in mice after ingestion of carnosine or  $\beta$ -alanine. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 9, 15.
- Mong, M. C., Chao, C. Y., & Yin, M. C. (2011). Histidine and carnosine alleviated hepatic steatosis in mice consumed high saturated fat diet. *European Journal of Pharmacology*, 653, 82-88.
- Monin, G., Mejenes-Quijano, A., Talmant, A., & Sellier, P. (1987). Influence of breed and muscle metabolic type on muscle glycolytic potential and meat pH in pigs. *Meat Science*, 20, 149-158.
- Monin, G., & Sellier, P. (1985). Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the immediate post-mortem period: The case of the Hampshire breed. *Meat Science*, 13, 49-63.
- Mora, L., Sentandreu, M. Á., & Toldrá, F. (2008). Contents of creatine, creatinine and carnosine in porcine muscles of different metabolic types. *Meat science*, 79, 709-715.

- O'Neill, D. J., Lynch, P. B., Troy, D. J., Buckley, D. J., & Kerry, J. P. (2003). Influence of the time of year on the incidence of PSE and DFD in Irish pig meat. *Meat Science*, *64*, 105-111.
- Pouliot, E., Gariépy, C., Theriault, M., Avezard, C., Fortin, J., & Castonguay, F. W. (2009). Growth performance, carcass traits and meat quality of heavy lambs reared in a warm or cold environment during winter. *Canadian Journal of Animal Science*, *89*, 229-239.
- Pouliot, E., Gariépy, C., Thériault, M., Avezard, C., Fortin, J., Simmons, N. J., et al. (2012). Effects of low-voltage electrical stimulation and aging on lamb meat quality. *Canadian Journal of Animal Science*, *92*, 59-66.
- Ramamoorthy, S., Leibach, F. H., Mahesh, V. B., Han, H., Yang-Feng, T., Blakely, R. D., et al. (1994). Functional characterization and chromosomal localization of a cloned taurine transporter from human placenta. *Biochemical Journal*, *300*, 893-900.
- Reig, M., Aristoy, M. C., & Toldrá, F. (2013). Variability in the contents of pork meat nutrients and how it may affect food composition databases. *Food chemistry*, *140*, 478-482.
- Ryu, Y.C., Choi, Y. M., & Kim, B. C. (2005). Variations in metabolite contents and protein denaturation of the *longissimus dorsi* muscle in various porcine quality classifications and metabolic rates. *Meat Science*, *71*, 522-529.
- Sakata, K., Yamashita, T., Maeda, M., Moriyama, Y., Shimada, S., & Tohyama, M., (2001). Cloning of a lymphatic peptide/histidine transporter. *Biochemical Journal*, *356*, 53-60.
- Sale, C., Saunders, B., & Harris, R. C. (2010). Effect of beta-alanine supplementation on muscle carnosine concentrations and exercise performance. *Amino acids*, *39*(2), 321-333.
- Sale, C., Artioli, G. G., Gualano, B., Saunders, B., Hobson, R. M., & Harris, R. C. (2013). Carnosine: from exercise performance to health. *Amino Acids*, *44*, 1477-1491.
- SAS Institute Inc. (2002). SAS Statistical Analysis System user's guide Release 9.1. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA.

- Scheffler, T. L., & Gerrard, D. E. (2007). Mechanisms controlling pork quality development: The biochemistry controlling postmortem energy metabolism. *Meat Science*, *77*, 7-16.
- Smith, K. E., Borden, L. A., Wang, C. D., Hartig, P. R., Branchek, T. A., & Weinshank, R. L. (1992). Cloning and expression of a high affinity taurine transporter from rat brain. *Molecular Pharmacology*, *42*, 563-569.
- Smith, D. E., Cl  men  on, B., & Hediger, M. A. (2013). Proton-coupled oligopeptide transporter family SLC15: Physiological, pharmacological and pathological implications. *Molecular Aspects of Medicine*, *34*, 323-336.
- Srere, P. A. (1969). Citrate synthase. *Methods in enzymology*, *13*, 3-11.
- Straadt, I. K., Aaslyng, M. D., & Bertram, H. C. (2014). An NMR-based metabolomics study of pork from different crossbreeds and relation to sensory perception. *Meat Science*, *96*, 719-728.
- Takami, N., Ikeda, T., & Funatsuka, A. (1983). Zinc as activating cation for muscle glycolysis. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. *29*, 655-662.
- Teufel., M., Saudek, V., Ledig, J. P., Bernhardt, A., Boularand, S., Carreau, A., et al. (2003). Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, *278*, 6521-6531.
- Thwaites, D. T., & Anderson, C. M. H. (2011). The SLC36 family of proton-coupled amino acid transporters and their potential role in drug transport. *British Journal of Pharmacology*, *164*, 1802-1816.
- Yamashita, T., Shimada, S., Guo, W., Sato, K., Kohmura, E., Hayakawa, T., et al. (1997). Cloning and functional expression of a brain peptide/histidine transporter. *Journal of Biological chemistry*, *272*, 10205-10211.
- Yang, P., Hao, Y., Feng, J., Lin, H., Feng, Y., Wu, X. et al. (2014). The expression of carnosine and its effect on the antioxidant capacity of *longissimus dorsi* muscle in finishing pigs exposed to constant heat stress. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *27*, 1763-1772.

Zaloga, G. P., Roberts, P. R., Black, K. W., Lin, M., Zapata-Sudo, G., Sudo, R. T., et al. (1997). Carnosine is a novel peptide modulator of intracellular calcium and contractility in cardiac cells. *American Journal of Physiology*, 272, H462-H468.

## CHAPITRE 3

### DEUXIÈME ARTICLE RÉDIGÉ

#### 3.1. Présentation du deuxième article

L'article qui suit porte sur les résultats obtenus pour l'objectif 4 de mon projet de maîtrise (voir section « Hypothèse et objectifs »). Plus précisément, cet article présente l'identification de 27 SNPs localisés dans les séquences codantes ou 3' non traduites (3' UTR) des gènes *CARNS1*, *SLC6A6*, *SLC15A3* et *SLC15A4*. Ces gènes ont été sélectionnés en raison de leur implication dans la synthèse de la carnosine (*CARNS1*) ou encore dans le transport de la carnosine et de ses précurseurs (*SLC6A6*, *SLC15A3* et *SLC15A4*). Parmi tous ces SNPs, 4 ont été choisis pour effectuer des analyses d'associations. Deux d'entre eux sont situés dans la séquences codante de *SLC15A4* (c.658A>G et c.818G>A) et entraînent la substitution d'une isoleucine pour une valine (c.658A>G) et d'une sérine pour une asparagine (c.818G>A). Les 2 autres SNPs sont situés en 3' UTR dans une séquence consensus reconnue par un microRNA (*SLC15A3* c.\*35C>T et c.\*52C>T). Des analyses de fréquences alléliques, des génotypes et des haplotypes sont présentées, de même que des analyses d'association entre les différents génotypes et diplotypes identifiés (pour les SNPs c.658A>G, c.818G>A, c.\*35C>T et c.\*52C>T) et différents paramètres de qualité de la viande et niveaux de carnosine et d'ansérine musculaire.

#### 3.2. Référence

Le présent article sera soumis à la revue *Meat Science* en février 2017, suite à la publication du premier article.



### **3.3. Implication de l'auteur dans l'article**

Les résultats ont été majoritairement produits par l'auteur principal de l'article ainsi que la rédaction de toutes les sections de l'article. Ma directrice, Marie-France Palin, a supervisé les procédures expérimentales ainsi que la rédaction de l'article. Comme un projet de recherche est un travail d'équipe, des collaborateurs ont aussi contribué au niveau technique (Danièle Beaudry, Hélène Groutsch et Simon Cliche) ou au niveau de la rédaction (Richard Blouin, Marie-France Palin et les co-auteurs de cet article).

### **3.4. Impact de cet article**

En premier lieu, un total de 27 polymorphismes (SNP) a été identifié et quatre SNPs ont été conservés pour effectuer des analyses d'association. Les deux premiers SNPs conservés sont présents dans la séquence codante du gène SLC15A4 (c.658A>G; c.818G>A) et entraînent un changement d'acide aminé (Ile220Val et Ser273Asn, respectivement). Ces modifications pourraient entraîner un changement de conformation ou encore modifier la phosphorylation d'une sérine pouvant avoir un impact sur l'activité de transport de SLC15A4. Les résultats des analyses d'association démontrent que les animaux ayant le génotype SLC15A4 c.658AA ou le diplotype SLC15A4 AA/GG présentent un contenu musculaire en carnosine plus élevé, ainsi qu'une amélioration de certains critères de qualité de la viande tels que la couleur (jaunissement), les pertes en eau et le pH à 24 h. Les deux autres SNPs conservés sont présents au niveau de la séquence 3' non codante du gène SLC15A3 (c.\*35C>T, c.\*52C>T) et modifient un site reconnu par un micro-ARN. Les micro-ARN étant des régulateurs post-transcriptionnels capables de moduler l'expression d'un gène, une mutation sur un tel site pourrait influencer la transcription du gène en question. Par contre, les résultats de cet article démontrent qu'il n'y aurait pas d'effet de ces SNPs sur l'expression génique de SLC15A3, de

même que sur le contenu en carnosine musculaire. En conclusion, les résultats présentés dans cet article suggèrent qu'il serait avantageux de sélectionner les animaux présentant le génotype c.658AA ou le diplotype AA/GG dans le gène SLC15A4 afin d'augmenter les niveaux de carnosine musculaire et d'améliorer la qualité de la viande chez le porc. Cependant, la fréquence des allèles favorables pour ce SNP (c.658A>G) est déjà très élevée chez les porcs Duroc (99%) et Landrace (91%) utilisés dans cette étude, ce qui limiterait le gain possible en termes d'amélioration de la qualité de la viande. Avec une fréquence de 17% observée chez les Yorkshires pour l'allèle mineure du SNP c.658A>G, une certaine amélioration génétique serait envisageable.

Par contre, il serait important d'effectuer des études supplémentaires pour mieux caractériser les effets de ces polymorphismes sur l'activité des transporteurs liés au métabolisme de la carnosine.

### **3.5. Identification of single nucleotide polymorphisms in carnosine-related genes and effects of genotypes and diplotypes on pork meat quality attributes**

Joël D'Astous-Pagé<sup>a,b</sup>, Claude Gariépy<sup>c</sup>, Richard Blouin<sup>a</sup>, Simon Cliche<sup>c</sup>, Steve Méthot<sup>b</sup>, Brian Sullivan<sup>d</sup>, Frédéric Fortin<sup>e</sup> and Marie-France Palin<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup>*Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, 2500 boul. de l'Université, Sherbrooke, QC, Canada*

<sup>b</sup>*Sherbrooke Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, 2000 College Street, Sherbrooke, QC, Canada*

<sup>c</sup>*Saint-Hyacinthe Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, 3600 boul. Casavant West, Saint-Hyacinthe, QC, Canada*

<sup>d</sup>*Canadian Centre for Swine Improvement, 960 Carling Avenue, Building 75, Ottawa, ON, Canada*

<sup>e</sup>*Centre de développement du porc du Québec, Place de la Cité - Tour Belle Cour, 450 - 2590, boulevard Laurier, Québec, QC, Canada*

\*Corresponding author: Sherbrooke Research and Development Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, 2000 College Street, Sherbrooke, QC, Canada, J1M 0C8

*E-mail address:* [mariefrance.palin@agr.gc.ca](mailto:mariefrance.palin@agr.gc.ca) (M.F. Palin)

### 3.5.1. Abstract

Muscle carnosine has pH-buffering, carbonyl scavenging and antioxidant properties that may bring advantages in terms of meat quality attributes. This study aimed at identifying polymorphisms in carnosine-related genes (CARNS1, SLC6A6, SLC15A3, SLC15A4) that might associate with muscle carnosine content and meat quality traits in purebred pigs (n = 590). Twenty seven SNPs were identified and association analyses performed for SLC15A3 c.\*35C>T and c.\*52C>T (3'UTR region), and SLC15A4 c.658A>G (Ile220Val) and c.818G>A (Ser273Asn) SNPs. Associations were observed for SNP c.658A>G with carnosine content, color b\* and L\*, drip and cooking losses, pH 24 h and glycolytic potential values ( $P \leq 0.05$ ). The same associations were observed for SNP c.818G>A, but they were not significant after FDR correction. Pigs with diplotype SLC15A4 AA/GG had lower color b\* and drip loss values ( $P \leq 0.05$ ) and association with drip loss remained significant after FDR correction. Results suggest that specific SLC15A4 gene variants might increase muscle carnosine content and improve pork meat quality traits.

*Keywords:* Carnosine; *Longissimus thoracis* muscle; Meat quality; Pig; SNP.

### 3.5.2. Introduction

Carnosine ( $\beta$ -alanyl-L-histidine) is a cytoplasmic dipeptide that is found in several mammalian tissues, with highest concentrations being observed in skeletal muscle (Hipkiss, 2009). Different physiological functions have been attributed to carnosine, including pH-buffering, carbonyl scavenging and antioxidant properties (Boldyrev, Aldini & Derave, 2013). Major determinants in muscle carnosine content include the muscle fibre type, with

type II fibres having higher carnosine content than type I, diet (including beta-alanine supplementation), age, gender and training (Harris et al., 2012). Recent findings further suggest that the genetic background may also be a key determinant in skeletal muscle carnosine content. For example, muscle carnosine content in human is highly correlated in monozygotic ( $r = 0.86$ ), when compared with dizygotic twins ( $r = 0.51$ ) (Baguet, Everaert, Achten, Thomis & Derave, 2012). Muscle carnosine and anserine ( $\beta$ -alanyl-1-methyl-L-histidine) concentrations were found to be moderately heritable in Angus cattle, with heritability estimates of 0.383 and 0.531, respectively (Mateescu et al., 2012). Moreover, muscle carnosine content was found to vary among different purebred (D'Astous-Pagé et al., 2016) or crossbred (Straadt, Aaslyng & Bertram, 2014) pigs, thus suggesting a possible genetic background effect on muscle carnosine levels.

Our group recently reported that pigs with high *longissimus thoracis* carnosine content had higher pH 24 h, better water holding capacity and decreased meat yellowness ( $b^*$ ) and lightness ( $L^*$ ) values when compared with pigs having low muscle carnosine concentrations (D'Astous-Pagé et al., 2016). Improved redness and drip loss (at 48 h) values, along with higher pH values at 45 min and 24 h post-mortem, were also observed in skeletal muscles of pigs that were supplemented with carnosine at 100 mg/kg diet (Ma, Jiang, Lin, Zheng & Zhou, 2010). Therefore, these studies suggest that pigs with higher muscle carnosine level could bring advantages in terms of meat quality.

Carnosine synthase 1 (CARNS1) belongs to the ATP-grasp family of ligases and is a cytosolic enzyme that synthesizes carnosine from  $\beta$ -alanine and L-histidine in the skeletal muscle (Drozak, Veiga-da-Cunha, Vertommen, Stroobant & Van Schaftingen, 2010). The CARNS1 transcript was observed in the pig skeletal muscle (Yang et al., 2014) and, more recently, its mRNA abundance was found to be modulated according to pig breeds and muscle carnosine concentrations (D'Astous-Pagé et al., 2016). In the latter study, an increase

in skeletal muscle transcript abundance of solute carrier family 15, member 3 (SLC15A3) and member 4 (SLC15A4) genes was observed in Duroc pigs with high muscle carnosine content. The SLC15A3 and SLC15A4 genes encode for proton-coupled L-histidine/peptides transporters with proven transport activity towards carnosine (Boldyrev, Aldini & Derave, 2013). Everaert, De Naeyer, Taes and Derave (2013) suggested that the solute carrier family 6, member 6 (SLC6A6) gene would be the main transporter of  $\beta$ -alanine in the mouse skeletal muscle. Since  $\beta$ -alanine is the rate-limiting precursor in carnosine synthesis, its up-regulation may also contribute in elevating the muscle carnosine content. These carnosine-related genes (e.g. CARNS1, SLC6A6, SLC15A3 and SLC15A4) have been cloned and sequenced in pigs and several variants identified for each gene (see the dbSNP database at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), however, the effect of these polymorphisms on muscle carnosine content and on pork meat quality attributes have never been investigated.

Based on the abovementioned studies, we hypothesized that polymorphisms in the CARNS1, SLC6A6, SLC15A3 and SLC15A4 genes might affect muscle carnosine and anserine (methylated analogue of carnosine) content and pork meat quality traits. Therefore, our study objectives were (1) to identify single nucleotide polymorphisms in the porcine coding and 3' UTR sequences of the CARNS1, SLC6A6, SLC15A3 and SLC15A4 genes, (2) to look for possible associations between identified SNPs and the *longissimus thoracis* carnosine and anserine content, and (3) for associations between these polymorphisms and meat quality traits in purebred pigs.

### 3.5.3. Materials and methods

#### 3.5.3.1. Animals, tissue sample collection and phenotypes

A total of 590 purebred barrows were used for this study, including Duroc (n = 177), Landrace (n = 179) and Yorkshire (n = 234). These pigs came from 19 breeding herds across Canada (2 barrows/litter) and entered the Deschambault test station (Quebec, Canada) in two batches (test 27 (n = 320) and test 28 (n = 270)), between 10 and 16 days old. They were raised under similar management conditions and fed *ad libitum* with cube-texture feed, following a 3-phase feeding program. Pigs were slaughtered in a commercial abattoir upon reaching 120 kg liveweight. Tests 27 and 28 were completed in May 2010 and November 2010, respectively. *Longissimus thoracis* muscle sampling was performed immediately after slaughter and tissues were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Meat quality measurements were conducted 24 h post-mortem. Studied meat quality parameters included meat color a\*, b\* and L\*, water holding capacity (drip loss %, cooking loss % and freezing loss %), physical and chemical analyses (fat, protein and moisture content (%), pH 24 h and shear force (kg)), and the glycolytic potential ( $\mu\text{mol}$  of lactate eq/g tissue). Details on experimental procedures used for meat quality measurements are provided in D'Astous-Pagé et al. (2016, submitted). Anserine and carnosine content was measured in the right *longissimus thoracis* muscle using a high-performance liquid chromatography (HPLC) method adapted from Mora, Sentandreu and Toldrá (2008) and as described in D'Astous-Pagé et al. (2016, submitted). These dipeptide analyses were performed on 427 pigs (137 Duroc, 126 Landrace and 164 Yorkshire) sampled from the purebred barrows population (n = 590) described above. Table B1 presents the summary statistics of muscle anserine and carnosine content and of studied meat quality parameters. The national guidelines for the care and use of animals were followed as recommended by the Canadian Council on Animal Care (CCAC, 2009) and the experimental protocol was approved by the institutional animal care

committee of the Dairy and Swine Research and Development Centre (Sherbrooke, QC, Canada).

**Table B1. Summary statistics (Mean  $\pm$  standard deviation) of meat quality traits and anserine and carnosine content in pig *longissimus thoracis* muscle.**

Traits	Duroc	Landrace	Yorkshire	Across breeds
<i>Anserine and carnosine muscle content</i>	n = 137	n = 126	n = 164	n = 427
Anserine (mg/100 g muscle)	19.38 $\pm$ 3.19	20.15 $\pm$ 3.07	21.08 $\pm$ 3.11	20.26 $\pm$ 3.20
Carnosine (mg/100 g muscle)	287.81 $\pm$ 39.59	272.66 $\pm$ 33.46	282.07 $\pm$ 33.47	281.13 $\pm$ 35.97
<i>Meat quality parameters</i>	n = 177	n = 179	n = 234	n = 590
<i>Meat color<sup>1</sup></i>				
Color a*	4.40 $\pm$ 1.03	4.35 $\pm$ 1.15	4.84 $\pm$ 1.18	4.56 $\pm$ 1.15
Color b*	6.46 $\pm$ 1.06	6.92 $\pm$ 1.07	6.82 $\pm$ 0.96	6.74 $\pm$ 1.04
Color L*	50.75 $\pm$ 3.04	52.58 $\pm$ 3.02	51.39 $\pm$ 2.72	51.56 $\pm$ 2.99
<i>Water holding capacity</i>				
Cooking loss (%)	18.14 $\pm$ 2.35	19.17 $\pm$ 1.78	18.95 $\pm$ 1.65	18.78 $\pm$ 1.96
Drip loss (%)	2.71 $\pm$ 2.27	3.98 $\pm$ 2.23	3.51 $\pm$ 2.11	3.41 $\pm$ 2.25
Freezing loss (%)	8.00 $\pm$ 2.44	8.43 $\pm$ 2.20	8.41 $\pm$ 2.06	8.29 $\pm$ 2.22
<i>Physical and chemical traits</i>				
Fat content (%)	5.57 $\pm$ 1.20	5.08 $\pm$ 1.09	4.89 $\pm$ 1.03	5.15 $\pm$ 1.14
Moisture content (%)	72.23 $\pm$ 1.17	72.53 $\pm$ 1.11	72.53 $\pm$ 1.10	72.44 $\pm$ 1.13
Protein content (%)	21.75 $\pm$ 0.73	22.19 $\pm$ 0.65	22.41 $\pm$ 0.66	22.14 $\pm$ 0.73
pH 24 h	5.69 $\pm$ 0.16	5.58 $\pm$ 0.10	5.60 $\pm$ 0.10	5.62 $\pm$ 0.13
Shear force (kg)	2.47 $\pm$ 0.54	2.79 $\pm$ 0.56	2.84 $\pm$ 0.43	2.71 $\pm$ 0.53
Glycolytic potential <sup>2</sup>	161.06 $\pm$ 38.08	164.27 $\pm$ 22.77	159.27 $\pm$ 25.00	161.32 $\pm$ 29

<sup>1</sup> Color a\*, b\* and L\* are estimated with a Minolta Chroma Meter CR-300 colorimeter.

<sup>2</sup> Glycolytic potential ( $\mu$ mol of lactate eq/g tissue).

### 3.5.3.2. SNP screening

A total of 28 Duroc, 27 Landrace and 30 Yorkshire pigs were selected to identify polymorphisms in coding regions and in 3' UTR of the CARNS1, SLC6A6, SLC15A3 and



SLC15A4 genes. These pigs were selected based on their muscle carnosine content and included barrows with high and low values within each breed. Total RNA was extracted from *longissimus thoracis* muscle samples and cDNA synthesized as previously reported (Labrecque et al., 2009). For each studied gene, PCR amplifications of the coding and 3' UTR regions were performed and amplified fragments sequenced for detection of polymorphisms. For PCR amplifications, the 25- $\mu$ l reaction mixture contained 5  $\mu$ l of 5X Q5 reaction buffer, 0.5  $\mu$ M of each primer (see Table B2), 200  $\mu$ M dNTP, 0.5 U Q5 Hot Start High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) and 100 ng of cDNA. Cycling conditions consisted of an initial denaturation at 98 °C for 30 sec, followed by 40 cycles of 98 °C for 10 s, corresponding annealing temperature for 30 s (Table B2) and 72 °C for 30 s, and a final step at 72 °C for 2 min. Primers were designed using the primer express 3.0 software (Applied Biosystems, Life Technologies, Burlington, ON, Canada) and primer sequences are provided in Table B2. Sequencing of amplified PCR fragments was then performed using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) on an Applied Biosystems 3730xl DNA Analyser (Applied Biosystems). Nucleotide sequences were assembled and compared with available porcine sequences in the GenBank sequence database (Table B2) and the SeqScape software v3.0 (Applied Biosystems) was used to identify DNA polymorphisms in studied genes. The identification of previously reported SNPs was performed using the dbSNP short genetic variation website from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). Single nucleotide polymorphisms database (dbSNP) reference ID is provided in Table B3. For SNPs located in 3' UTR regions, flanking sequences were searched against the miRBase database (Release 21.0; <http://www.mirbase.org/>) to identify miRNA consensus sequences.

**Table B2. Primer sequences and optimal PCR conditions used for sequencing of the porcine coding and 3' UTR regions of the CARNS1, SLC6A6, SLC15A3 and SLC15A4 genes.**

Gene symbols <sup>1</sup>	Primer name	Primer sequence (5'>3')	GenBank accession no.	Hybridization position (nt)	Annealing temp. (°C)	No. of cycles
CARNS1	CARNS-F1 <sup>2</sup>	CGCCAGTCTCTTCCAACAGT	KF887959.2	88 - 107	68	40
	CARNS-R1	CTCGTGGGTACAGACGCAAT		1030 - 1049		
	CARNS-F2	CCTGCTTGGCTGACAAAGGT	KF887959.2	521 - 540	69	37
	CARNS-R2	CAAAGTCCACCCCGAGGAAG		1471 - 1490		
	CARNS-F3	GCCCCTGCTGAGCAAGATGT	KF887959.2	1231 - 1250	69	40
	CARNS-R3	CAGATGCACCTTGAGTCCGTAG		1747- 1768		
	CARNS-F4	CGGCTTCAGCAAGAAGTTCG	KF887959.2	1708 - 1727	68	40
	CARNS-R4	CAGTCTCGCAGGTAGAAGCC		2588- 2607		
	CARNS-F5	CGAGCACTTTTCCCGGATCT	KF887959.2	2218 - 2237	68	40
	CARNS-R5	CTTGGTGTGCAAACAGCCCT		3145 - 3164		
SLC6A6	SLC6A6-F1	GACATGGCCACCAAGGAGAA	KF800732.2	1 - 17	68	40
	SLC6A6-R1	CATCAGCAATGTCCACCCCT		1065 - 1084		
	SLC6A6-F2	GCTGGGATGCCTGAACAGT	XM_013982005.1	998 - 1016	65	40
	SLC6A6-R2	TTGCTGGCAAGATCAATTCAAG		2257 - 2278		
SLC15A3	SLC15A3-F1	AAAGGAGGGCGTCCAGTTTAGG	KU722392.1	1 - 22	68	37
	SLC15A3-R1	ATAGAGGAACAGGCTGAGTGTGAT		384 - 407		
	SLC15A3-F2	CCTGTTCTCTATCTGACCGC	KU722392.1	395 - 415	68	37
	SLC15A3-R2	ATGAGCAGGTACTGAGGGGT		1458 - 1477		
	SLC15A3-F3	GCGTTTAGAGTACATTGGTCACAAC	KU722392.1	1367 - 1391	67	37
SLC15A3-R3	ATGCTGGGTACAGAATAAACTGAGA		1895 - 1919			
SLC15A4	SLC15A4-F1	GCTGGCGTTTCCTAGT	KF800734.1	45 - 61	68	40
	SLC15A4-R1	CGACGCCGATACACACAGTA		733 - 752		
	SLC15A4-F2	GGAGCATTAACCTGGGAGCA	KF800734.1	645 - 664	68	40
	SLC15A4-R2	GGGTGGCTCCTTGAATAGCA		1666 - 1685		

<sup>1</sup> CARNS1, carnosine synthase 1; SLC6A6, solute carrier family 6, member 6; SLC15A3, solute carrier family 15, member 3; SLC15A4, solute carrier family 15, member 4. <sup>2</sup>F, forward and R, reverse primers

### 3.5.3.3. DNA extraction and SNP genotyping

Genomic DNA was extracted from the *longissimus thoracis* muscle of all available pigs (n = 590) by DNA LandMarks (Saint-Jean-sur-Richelieu, QC, Canada). Genotyping was carried out for polymorphisms that resulted in an amino acid substitution (Table B3, SLC15A4 c.658A>G and c.818G>A) or were present in 3' UTR miRNA binding sites (Table B3, SLC15A3 c.\*35C>T and c.\*52C>T). Animals were genotyped using the TaqMan SNP genotyping assay (Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada) that includes allele specific minor groove binder (MGB) probes labeled with VIC or FAM fluorescent dye (Shen,

Abdullah & Wang, 2009). Allele discrimination was carried out on a 7500 fast real-time PCR system (Applied Biosystems). Primers and MGB probes used for genotyping are listed in Table B4.

**Table B3. Identification of DNA polymorphisms in the porcine CARNS1, SLC6A6, SLC15A3 and SLC15A4 genes.**

Genes <sup>1</sup>	Polymorphisms <sup>2</sup>	Location	Effect	Flanking sequences <sup>3</sup>	References <sup>4</sup>
CARNS1	c.204T>C	Exon 3	Silent	tccactacta Y agcctcctgc	rs325868038
	c.480T>C	Exon 5	Silent	actcaggggg Y ctgacattcc	rs341692341
	c.612G>A	Exon 5	Silent	aggagcctcg R gccgagctgg	rs331644829
	c.678C>T	Exon 5	Silent	agcagggtga Y gtggcctgc	rs81355930
	c.2130T>C	Exon 10	Silent	aggtcgaggc Y gaccacccc	rs338937385
	c.2202C>T	Exon 10	Silent	gcaccgaaca Y gatgtggatc	rs698486262
	c.2319A>G	Exon 10	Silent	ctgggctggc R ccggagcagg	rs81355937
SLC6A6	c.405C>T	Exon 2	Silent	ccctcctgaa Y atatactaca	rs342573379
	c.1392C>T	Exon 9	Silent	atgcagctag Y ggtgtatgcc	rs318638268
	c.*51C>T	Exon 12	N/A	acattagatt Y tcattaggacc	New SNP
	c.*169G>A	Exon 12	N/A	agagagaggg R tgtgtgtgtg	rs334144580
	c.*242A>C	Exon 12	N/A	aagaaacccc M cgggcagatg	New SNP
SLC15A3	c.67A>C	Exon 1	Silent	gctggcgcgc M ggcccggggg	rs319426007
	c.498G>C	Exon 1	Silent	tgctgctgct S ctcgccctgg	rs81362214
	c.519C>A	Exon 1	Silent	ccgccagctc M gtcaggagca	rs332515031
	c.624C>T	Exon 2	Silent	tcaatgtggg T gctgtgctgt	rs336127742
	c.645C>A	Exon 2	Silent	cgctgctggt M gtggccttta	rs322051730
	c.1674C>T	Exon 8	Silent	tcatcggcatt Y gctgggcgct	rs333362812
	c.*35C>T	Exon 8	miRNA site	gccccacctc Y gccccctgc	rs323072555
	c.*52C>T	Exon 8	miRNA site	cttgcctctc Y ccacccccca	rs340833133
SLC15A4	c.423G>C	Exon 1	Silent	gtcccgcgc S cccctcget	rs342929086
	c.606A>G	Exon 2	Silent	caattgtctc R ctgggaggca	rs341003394
	c.618C>T	Exon 2	Silent	tgggaggcat Y gcctacattc	rs320068986
	c.658A>G	Exon 2	Ile220Val	cactggctac R tcattcctac	rs329530950
	c.818G>A	Exon 2	Ser273Asn	cacagtcta R tgggtgagtg	rs321510718
	c.924G>A	Exon 3	Silent	tggagatgt R aaagctctg	rs319807150
	c.1407A>G	Exon 7	Silent	tggatttgc R tactcggctg	rs328500878

<sup>1</sup> CARNS1, carnosine synthase 1; SLC6A6, solute carrier family 6, member 6; SLC15A3, solute carrier family 15, member 3; SLC15A4, solute carrier family 15, member 4. <sup>2</sup> c., indicate that the polymorphism is located in the coding region and position beginning at the start codon; c.\*, indicate that the polymorphism is located in the 3'UTR and position beginning at the termination codon of corresponding cDNA sequences. <sup>3</sup> M = A or C; R = A or G; S = C or G; Y = T or C.

<sup>4</sup> Single nucleotide polymorphism database (dbSNP) references ID.

**Table B4. Primer sequences used to amplify regions of the porcine SLC15A3 and SLC15A4 genes containing DNA polymorphisms and MGB probes used for genotyping.**

Genes <sup>1</sup>	Polymorphisms <sup>2</sup>	Primer sequence (5'→3') <sup>3</sup>	GenBank accession no.	Position (nt)	MGB <sup>4</sup>
SLC15A3	c.*35C>T	(F) GGAGGGACAGTGGCTAAACAG	KU722392	1804 - 1824	
		(R) GATTGCCGCTGTCTGAGTTG		1859 - 1878	
		CCACCTC <u>C</u> GCCCCCT			VIC
			CCACCTC <u>I</u> GCCCCCT		FAM
	c.*52C>T	(F) GGAGGGACAGTGGCTAAACAG	KU722392	1804 - 1824	
		(R) GATTGCCGCTGTCTGAGTTG		1859 - 1878	
TTGCCTCTC <u>C</u> CCACCC				VIC	
		TTGCCTCTC <u>I</u> CCACCC		FAM	
SLC15A4	c.658A>G	(F) CAGCAGAACGTCAGCTTTGTC	KF800734	695 - 715	
		(R) GCAGAGGAAGACCATGAAAGC		752 - 772	
		ACTGGCTAC <u>G</u> TCATCC			VIC
			CTGGCTAC <u>A</u> TCATCC		FAM
	c.818G>A	(F) TCGTGCCGTCCCCAAA	NC_010456.4	27779458 - 27779474	
		(R) ACCAGTGAAACAGCCTGTGATG		27779539 - 27779518	
ACACAGTCCTA <u>G</u> TGGGTG				VIC	
		CACAGTCCTA <u>A</u> TGGGTG		FAM	

<sup>1</sup> SLC15A3, solute carrier family 15, member 3; SLC15A4, solute carrier family 15, member 4.

<sup>2</sup> c., indicates that the polymorphism is located in the coding region and position of SNP begins at the start codon; c.\*, indicates that the polymorphism is located in the 3'UTR and position of SNP begins at the termination codon of corresponding cDNA sequences.

<sup>3</sup> Polymorphisms within minor groove binding (MGB) VIC and FAM probes are indicated in bold and underlined letters. (F), forward and (R), reverse primers.

<sup>4</sup> Fluorescently labelled MGB probes used to identify alleles.

### 3.5.3.4. Transcript abundance of SLC15A3 and SLC15A4 genes in the longissimus thoracis muscle

To address the relationship between observed genotypes/diplotypes and mRNA abundance, quantitative real-time PCR analyses were performed for the SLC15A3 and SLC15A4 genes. Details on PCR mixture and cycling conditions, along with primer sequences used for amplifications are provided in D'Astous-Pagé et al. (2016 submitted). Transcript abundance analyses were conducted on all barrows from test 28, including Duroc (n = 84), Landrace (n =

87) and Yorkshire (n = 100) pigs for which muscle tissue samples were collected immediately after slaughter.

### 3.5.3.5. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the SAS statistical software version 9.3 (SAS 2002; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). For each SNP (c.\*35C>T, c.\*52C>T, c.658A>G, c.818G>A), allele and genotype frequencies were calculated within each breed and across breeds. Genotype frequency distribution was then tested for Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) using a chi-square ( $\chi^2$ ) test. Haplotypes were built with the PHASE software v2.1.1 (<http://stephenslab.uchicago.edu/phase/download.html>; University of Chicago, Chicago, IL, USA) and allocation of predicted diplotypes performed for the whole population (Stephens, Smith & Donnelly, 2001; Stephens & Scheet, 2005).

Association analyses between genotypes or diplotypes and carnosine and anserine content in the *longissimus thoracis* muscle and meat quality attributes were performed using the MIXED procedure of SAS. Equation of the mixed model was as follow:

$$Y_{ijkl} = \mu + G_j/D_j + B_k + T_l + e_{ijkl}$$

Where  $Y_{ijkl}$  is the studied trait (e.g. anserine content, carnosine content, meat quality attributes or gene mRNA abundance) value for the  $i^{\text{th}}$  animal of breed  $k$  in the  $l$  test having the genotype (G) or diplotype (D)  $j$ ;  $\mu$  is the overall mean effect;  $G_j/D_j$  is the fixed effect of genotype (G) or diplotype (D);  $B_k$  is the fixed effect of breed;  $T_l$  is the fixed effect of test (test 27 or test 28) and  $e_{ijkl}$  is the residual error. The LS Means were reported for each genotype or diplotype and, when genotype or diplotype effects  $P$ -values were  $\leq 0.05$ , differences between means were compared using all pair-wise analyses with a Tukey-Kramer correction. Using the SAS

MULTTEST procedure, a false discovery rate (FDR) correction was carried out to account for multiple testing, according to the Benjamini and Hochberg method (1995). The same model was used for SLC15A3 and SLC15A4 mRNA abundance except that the fixed effect of test ( $T_j$ ) was omitted from the equation as all muscle samples were collected from test 28. Statistical significance was set at  $P \leq 0.05$  and tendencies at  $0.05 < P \leq 0.10$ .

### **3.5.4. Results and discussion**

#### **3.5.4.1. Polymorphism identification**

A total of 27 SNPs were identified in the four studied genes (Table B3). With the exception of two SNPs (SLC6A6 c.\*51C>T and c.\*242A>C), all of these polymorphisms were already reported in the dbSNP database. In this study, seven SNPs were identified in the porcine CARNS1 gene (Table B3). These SNPs are located in the coding region and are all silent mutations. A total of five SNPs were identified in the porcine SLC6A6 gene (Table B3). Two of these SNPs are located in the coding region (c.405C>T and c.1392C>T), and the three other in the 3' UTR sequence (c.\*51C>T, c.\*169G>A and c.\*242A>C). The c.405C>T and c.1392C>T SNPs are both silent mutations. No further analyses were performed for the CARNS1 and SLC6A6 genes since identified SNPs do not change amino acids and are not located in microRNAs consensus sequences. Six SNPs were identified in the SLC15A3 gene coding region (c.67A>C, c.498G>C, c.519C>A, c.624C>T, c.645C>A and c.1674C>T) and two SNPs in the 3' UTR region (c.\*35C>T and c.\*52C>T). All SNPs detected in the SLC15A3 coding region are silent mutations (Table B3), whereas both mutations identified in the 3' UTR are located within a consensus sequence recognized by a microRNA (ssc-mir-149). As microRNAs are involved in post-transcriptional gene regulation and are known to have key roles in development, cell death, cell proliferation and differentiation (Vosa, Esko,

Kasela & Annilo, 2015), these two SNPs were further analysed. Finally, for the SLC15A4 gene, seven SNPs were found in the coding region. Two of these SNPs correspond to non-synonymous mutations (c.658A>G and c.818G>A), whereas the others are silent mutations (c.423G>C, c.606A>G, c.618C>T, c.924G>A and c.1407A>G). The two non-synonymous SNPs are located in exon 2 of the SLC15A4 gene. The c.658A>G SNP encodes for an isoleucine-to-valine (Ile220Val) replacement, and the c.818G>A SNP encodes for a serine-to-asparagine (Ser273Asn) modification (Table B3). The SLC15A3 and SLC15A4 genes encode for integral membrane peptide-histidine transporters, which are members of the proton-coupled oligopeptide transporter (POT) superfamily. As all members of the POT superfamily, the SLC15A3 and SLC15A4 proteins contain 12 predicted transmembrane domains (TMD) and intracellular N- and C-termini (Yamashita et al., 1997). Based on the rat SLC15A4 protein sequence (Yamashita et al., 1997), isoleucine 220 would be located in the sixth transmembrane domain (TMD6) and serine 273 in an intracellular loop located between TMD6 and TMD7. These two SNPs, along with the SLC15A3 c.\*35C>T and c.\*52C>T SNPs (microRNA), were further analysed to estimate allele, genotype and haplotype frequencies and to perform association studies with phenotypic traits evaluated in this study (e.g. muscle carnosine and anserine content, meat quality parameters and SLC15A3 and SLC15A4 mRNA abundance).

#### **3.5.4.2. Allele and genotype frequencies and deviation from Hardy-Weinberg equilibrium**

For the four selected SNPs, allele and genotype frequency analyses were conducted on the whole population of pigs (n = 590), for each breed and across breeds (Table B5). Mutant alleles identified in the 3' UTR region of the SLC15A3 gene (c.\*35C>T and c.\*52C>T) were present in all breeds. For the c.\*35C>T SNP, the highest minor allele frequency (MAF) was found in Landrace pigs (0.44) and a lowest in Duroc pigs (0.18). For the c.\*52C>T SNP, the

highest MAF was found in Duroc pigs (0.26) and the lowest in Landrace pigs (0.11). For these two mutations, all genotypes (e.g. CC, CT and TT) were detected in the three breeds. The mutant alleles identified in the porcine SLC15A4 gene (c.658A>G and c.818G>A) were present in all breeds, with the highest MAF being observed in Yorkshire pigs (0.17 for both SNPs) and the lowest in Duroc pigs (0.01). The SLC15A4 homozygous c.658GG and c.818AA genotypes were absent from Duroc breed. The c.\*35C>T and c.\*52C>T genotypes are distributed according to the Hardy–Weinberg equilibrium ( $P > 0.05$ , n.s.) except for the c.\*35C>T genotypes in Yorkshire pigs ( $P = 0.03$ ) and for the c.\*52C>T genotypes across breeds ( $P < 0.01$ ) and in Landrace ( $P = 0.02$ ) and Yorkshire ( $P = 0.03$ ) pigs. The c.658A>G and c.818G>A genotypes are distributed according to the Hardy–Weinberg equilibrium ( $P > 0.05$ , n.s.) except for genotype distribution across breeds ( $P < 0.01$  for c.658A>G and c.818G>A genotypes). Since the Hardy–Weinberg equilibrium was not respected for some of these SNPs, a decision was made to perform diplotype-based association analyses. Diplotypes are matched haplotype pairs from homologous chromosomes and several studies have reported that diplotypes are more powerful than haplotypes when performing association analyses of markers that are not in Hardy–Weinberg equilibrium (Zuo, Wang & Luo, 2014).



**Table B5. Genotype and minor allele frequencies of DNA polymorphisms within the SLC15A3 and SLC15A4 genes in Duroc, Landrace and Yorkshire pigs.**

Polymorphisms <sup>1</sup>	Breeds			
	Duroc	Landrace	Yorkshire	Across breeds
SLC15A3 c.*35C>T				
Genotype frequencies				
CC (n)	0.69 (121)	0.31 (55)	0.49 (114)	0.49 (290)
CT (n)	0.28 (50)	0.51 (90)	0.46 (108)	0.42 (248)
TT (n)	0.03 (6)	0.18 (33)	0.05 (12)	0.09 (51)
MAF <sup>2</sup>	0.18	0.44	0.28	0.30
HWE <i>P</i> -value <sup>3</sup>	n.s.	n.s.	0.03	n.s.
SLC15A3 c.*52C>T				
Genotype frequencies				
CC (n)	0.57 (101)	0.81 (145)	0.71 (167)	0.70 (413)
CT (n)	0.34 (60)	0.16 (28)	0.24 (56)	0.24 (144)
TT (n)	0.09 (16)	0.03 (5)	0.05 (11)	0.06 (32)
MAF <sup>2</sup>	0.26	0.11	0.17	0.18
HWE <i>P</i> -value <sup>3</sup>	n.s.	0.02	0.03	< 0.01
SLC15A4 c.658A>G				
Genotype frequencies				
AA (n)	0.99 (175)	0.83 (148)	0.70 (164)	0.83 (487)
AG (n)	0.01 (2)	0.17 (30)	0.25 (59)	0.15 (91)
GG (n)	0.00 (0)	≤ 0.01 (1)	0.05 (11)	0.02 (12)
MAF <sup>2</sup>	0.01	0.09	0.17	0.10
HWE <i>P</i> -value <sup>3</sup>	n.s.	n.s.	n.s.	< 0.01
SLC15A4 c.818G>A				
Genotype frequencies				
GG (n)	0.99 (175)	0.84 (150)	0.70 (165)	0.83 (490)
GA (n)	0.01 (2)	0.16 (28)	0.25 (58)	0.15 (88)
AA (n)	0.00 (0)	≤ 0.01 (1)	0.05 (11)	0.02 (12)
MAF <sup>2</sup>	0.01	0.08	0.17	0.10
HWE <i>P</i> -value <sup>3</sup>	n.s.	n.s.	n.s.	< 0.01

<sup>1</sup> c., indicates that the polymorphism is located in the coding region and position begins at the start codon; c.\*, indicates that the polymorphism is located in the 3' UTR and position begins at the termination codon of corresponding cDNA sequences.

<sup>2</sup> MAF, Minor allele frequency.

<sup>3</sup> Deviation from Hardy–Weinberg law. n.s., non-significant.

### 3.5.4.3. SLC15A3 and SLC15A4 haplotype frequencies

In this study, the SLC15A3 c.\*35C>T and c.\*52C>T SNPs segregated in four haplotypes identified as [C;C], [C;T], [T;C] and [T;T] (Table B6). These haplotypes were found in all breeds but [T;T] animals were rare in Duroc and Yorkshire pigs. The [T;T] haplotype was not included in diplotype association analyses since its frequency was < 0.05 across breeds. For the SLC15A4 c.658A>G and c.818G>A SNPs, four haplotypes were found ([A;G], [A;A], [G;G] and [G;A]) in the three studied breeds (Table B6). The [A;A] and [G;G] haplotype frequencies were low (< 0.05) in all breeds and these haplotypes were therefore excluded from diplotype association analyses.

**Table B6. Haplotype frequencies for the SLC15A3 and SLC15A4 genes in Duroc, Landrace and Yorkshire pigs.**

	Breeds			Across breeds n = 590
	Duroc n = 177	Landrace n = 179	Yorkshire n = 234	
SLC15A3 haplotypes <sup>1</sup>				
[C;C]	0.57	0.43	0.56	0.53
[C;T]	0.25	0.01	0.16	0.17
[T;C]	0.17	0.46	0.27	0.29
[T;T]	0.01	0.10	0.01	0.01
SLC15A4 haplotypes <sup>2</sup>				
[A;G]	0.99	0.91	0.82	0.90
[A;A]	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
[G;G]	< 0.01	0.01	< 0.01	0.01
[G;A]	< 0.01	0.08	0.17	0.09

<sup>1</sup>Haplotypes were constructed from two SLC15A3 polymorphisms (c.\*35C>T and c.\*52C>T).

<sup>2</sup>Haplotypes were constructed from two SLC15A4 polymorphisms (c.658A>G and c.818G>A).

#### 3.5.4.4. Association analyses

Association analyses for the SLC15A3 c.\*35C>T and c.\*52C>T SNPs are presented in Table B7. The c.\*35C>T SNP showed an association (tendency) with *longissimus thoracis* moisture content values. For this SNP, animals with the CC genotype had higher moisture content values when compared with the heterozygous CT genotype ( $P \leq 0.05$ ). For the c.\*52C>T SNP, a significant association was observed with the *longissimus thoracis* protein content ( $P \leq 0.05$ ) and tendencies were observed with anserine content ( $P = 0.075$ ) and meat color a\* ( $P = 0.059$ ) values. For this SNP, homozygous mutant pigs (TT) had lower protein content values when compared with CC and CT animals ( $P \leq 0.05$ ), and CC pigs showed higher color a\* values than heterozygous CT animals ( $P \leq 0.05$ ). None of these associations remained significant after applying a FDR correction and there were no associations between SLC15A3 c.\*35C>T and c.\*52C>T SNPs and other studied traits ( $P > 0.10$ ; Table B7). Since these polymorphisms are located within microRNA response elements, they might influence microRNA binding in the 3' UTR sequence of the SLC15A3 transcript and, therefore, affect its mRNA abundance in skeletal muscle. Such effect was previously observed in the solute carrier family 22 member 3 (SLC22A3) gene, which is involved in the transport of histamine, dopamine and metformin. In that study, SNP rs3088442 was found to recruit miR-147 to suppress the expression of the SLC22A3 A allele, known to be associated with coronary heart disease (Li et al., 2015). However, in the current study there was no relationship between SLC15A3 c.\*35C>T and c.\*52C>T SNPs and the SLC15A3 mRNA abundance in the *longissimus thoracis* muscle ( $P > 0.10$ ; data not shown), thus suggesting a limited impact of these SNPs on the regulation of transcription.

**Table B7. Effects of SLC15A3 genotypes on anserine and carnosine content in the *longissimus thoracis* muscle and on meat quality parameters across breeds.**

	c.*35C>T <sup>1</sup>			SEM	P-value <sup>2</sup>	c.*52C>T <sup>1</sup>			SEM	P-value <sup>2</sup>
	CC	CT	TT			CC	CT	TT		
<i>Anserine and carnosine muscle content</i>										
Frequencies (n)	0.51 (219)	0.40 (172)	0.08 (35)			0.68 (289)	0.25 (107)	0.07 (30)		
Anserine (mg/100 g muscle)	19.98	20.05	20.61	0.58	0.609	20.28	19.71	19.20	0.54	<b>0.075</b>
Carnosine (mg/100 g muscle)	282.11	276.56	280.45	6.13	0.328	278.62	281.70	284.25	5.96	0.571
<i>Meat quality parameters</i>										
Frequencies (n)	0.49 (290)	0.42 (248)	0.09 (51)			0.70 (413)	0.24 (144)	0.06 (32)		
Meat color <sup>3</sup>										
Color a*	4.47	4.61	4.54	0.18	0.369	4.59 <sup>a</sup>	4.35 <sup>b</sup>	4.66 <sup>ab</sup>	0.21	<b>0.059</b>
Color b*	6.69	6.80	6.80	0.16	0.430	6.77	6.65	6.79	0.19	0.421
Color L*	51.58	51.74	51.61	0.39	0.815	51.60	51.82	51.40	0.57	0.676
Water holding capacity										
Cooking loss (%)	18.65	18.89	18.46	0.27	0.188	18.79	18.66	18.36	0.46	0.544
Drip loss (%)	3.39	3.38	3.71	0.36	0.681	3.44	3.29	3.63	0.37	0.653
Freezing loss (%)	8.40	8.30	8.46	0.24	0.752	8.31	8.41	8.87	0.41	0.390
Physical and chemical traits										
Fat content (%)	5.10	5.22	5.41	0.20	0.237	5.14	5.31	5.14	0.21	0.364
Moisture content (%)	72.54 <sup>a</sup>	72.33 <sup>b</sup>	72.28 <sup>ab</sup>	0.17	<b>0.075</b>	72.45	72.30	72.73	0.21	0.134
Protein content (%)	22.10	22.14	22.15	0.09	0.794	22.12 <sup>a</sup>	22.19 <sup>a</sup>	21.84 <sup>b</sup>	0.12	<b>0.034</b>
pH 24 h	5.63	5.62	5.60	0.01	0.143	5.62	5.63	5.61	0.03	0.736
Shear force (kg)	2.69	2.72	2.66	0.07	0.572	2.70	2.69	2.69	0.09	0.957
Glycolytic potential <sup>4</sup>	160.48	162.20	163.02	3.66	0.747	160.73	164.41	158.10	4.88	0.407

<sup>1</sup> c.\*, indicates that the polymorphism is located in the 3'UTR and position begins at the termination codon of corresponding cDNA sequences. For each genotype, different lower case letters within row differ at  $P \leq 0.05$  after a Tukey adjustment.

<sup>2</sup> P-value, probability of the F test for genotype effect on studied traits. Significant P-values and tendencies are indicated in bold.

<sup>3</sup> Color a\*, b\* and L\* are estimated with a Minolta Chroma Meter CR-300 colorimeter.

<sup>4</sup> Glycolytic potential ( $\mu\text{mol}$  of lactate eq/g tissue).

Association analyses for the SLC15A4 c.658A>G and c.818G>A SNPs are shown in Table B8. For these SNPs, the c.658GG and c.818AA genotypes are not presented as their frequencies were < 0.05. For the c.658A>G SNP, significant associations were observed with the muscle carnosine content, color b\* and L\*, drip loss and cooking loss, pH 24 h and the glycolytic potential values ( $P \leq 0.05$ ). For this SNP, animals with the AA genotype had higher carnosine content and pH 24 h values and lower color b\*, color L\*, drip loss, cooking loss and glycolytic potential values when compared with AG pigs. Significant associations remained for drip loss and cooking loss ( $P \leq 0.05$ ) traits and tendencies were found for carnosine, color b\*, color L\*, pH 24 h and glycolytic potential values ( $P < 0.10$ ) after adjusting for multiple testing using a FDR correction (Table B8). These results suggest that selection in favour of the c.\*658A allele may increase muscle carnosine content and improve meat quality attributes. However, the high frequency of the c.658A allele in Duroc (e.g. 0.99) and Landrace (e.g. 0.91) pigs would limit potential meat quality improvements for these breeds. With a MAF frequency of 0.17 in Yorkshire pigs, a selection in favour of the c.\*658A allele may be considered as a mean to improve pork quality attributes for this breed. As mentioned above, the c.658A>G SNP results in a p.Ile220Val modification. Such modification was expected to have limited effects on the SLC15A4 tertiary structure and transport activity since it substitutes one small hydrophobic residue for another. However, previous studies have shown that an isoleucine-to-valine substitution can have major impact on transport activities. This was indeed demonstrated for the SLC2A7 (GLUT7) transporter where an Ile314Val mutation resulted in a loss of fructose transport (Manolescu, Salas-Burgos, Fischbarg & Cheeseman, 2005). A similar observation was made for the human dopamine transporter (SLC6A3) where an Ile152Val substitution reduced the dopamine transport by 57% (Lee et al., 2000). On the opposite, an activation of transport activity was observed for the Ile425Val variant of the human serotonin transporter (SLC6A4) (Kilic, Murphy & Rudnick, 2003). Therefore, the observed increase in muscle carnosine content in pigs with the AA genotype (SNP c.658A>G), when compared with AG heterozygous animals, might reflect an increase in carnosine transport activity. However, further work is needed to demonstrate the effect of SNP c.658A>G on SLC15A4 transport activity.

**Table B8. Effects of SLC15A4 genotypes on anserine and carnosine content in the *longissimus thoracis* muscle and on meat quality parameters across breeds.**

	c.658A>G <sup>1</sup>		SEM	P-value <sup>2</sup>	c.818G>A <sup>1</sup>		SEM	P-value <sup>2</sup>
	AA	AG			GG	GA		
<i>Anserine and carnosine muscle content</i>								
Frequencies (n)	0.83 (356)	0.14 (60)			0.84 (358)	0.14 (58)		
Anserine (mg/100 g muscle)	20.13	19.62	0.42	0.263	20.11	19.74	0.43	0.428
Carnosine (mg/100 g muscle)	281.00	270.60	3.90	<b>0.017††</b>	280.73	272.23	3.93	<b>0.053</b>
<i>Meat quality parameters</i>								
Frequencies (n)	0.83 (487)	0.15 (91)			0.83 (490)	0.15 (88)		
<i>Meat color<sup>3</sup></i>								
Color a*	4.53	4.56	0.14	0.817	4.53	4.56	0.15	0.838
Color b*	6.70	6.96	0.12	<b>0.047††</b>	6.71	6.95	0.13	<b>0.071</b>
Color L*	51.57	52.24	0.30	<b>0.040††</b>	51.59	52.15	0.31	<b>0.094</b>
<i>Water holding capacity</i>								
Cooking loss (%)	18.67	19.18	0.15	<b>0.005†</b>	18.70	19.04	0.16	<b>0.068</b>
Drip loss (%)	3.30	4.07	0.27	<b>0.007†</b>	3.32	3.99	0.27	<b>0.023</b>
Freezing loss (%)	8.34	8.56	0.20	0.318	8.35	8.51	0.20	0.473
<i>Physical and chemical traits</i>								
Fat content (%)	5.17	5.19	0.11	0.859	5.17	5.19	0.11	0.846
Moisture content (%)	72.46	72.35	0.11	0.366	72.46	72.36	0.11	0.396
Protein content (%)	22.13	22.07	0.07	0.493	22.13	22.04	0.07	0.259
pH 24 h	5.63	5.60	0.01	<b>0.034††</b>	5.63	5.61	0.01	<b>0.091</b>
Shear force (kg)	2.71	2.66	0.05	0.374	2.70	2.67	0.05	0.579
Glycolytic potential <sup>4</sup>	160.70	167.39	2.93	<b>0.039††</b>	160.84	166.80	3.01	<b>0.072</b>

<sup>1</sup> c., indicates that the polymorphism is located in the coding region and position begins at the start codon. The GG genotype (for SNP c.658A>G) and the AA genotypes (for SNP c.818G>A) are not presented in this table as their frequencies were below 0.05.

<sup>2</sup> P-value, probability of the F test for genotype effect on studied traits; Significant P-values and tendencies are indicated in bold. Significant (†) effect and tendency (††) after FRD correction for trait-wise multiple testing.

<sup>3</sup> Color a\*, b\* and L\* are estimated with a Minolta Chroma Meter CR-300 colorimeter.

<sup>4</sup> Glycolytic potential ( $\mu\text{mol}$  of lactate eq/g tissue).

For the SLC15A4 c.818G>A SNP, associations were also observed with the muscle carnosine content, color b\* and L\*, drip loss and cooking loss, pH 24 h and the glycolytic potential values. However, all of these associations were tendencies ( $P < 0.10$ ) with the exception of a significant association with drip loss ( $P \leq 0.05$ ). None of these associations remained significant after applying the FDR correction. Selecting for the c.658AA genotype would result in the selection of c.818GG animals since these two SNPs are closely linked. Indeed, among animals with the AA genotype for SNP c.658A>G ( $n = 487$ ), 484 had the GG genotype for c.818G>A. Therefore, it is not surprising to get the same associations between these SNPs and meat quality traits and muscle carnosine content (Table B8). The c.818G>A SNP corresponds to a serine-to-asparagine (Ser273Asn) substitution. Serine and asparagine are both polar amino acids. Serine contains a reactive hydroxyl group, is common in protein functional centres, and can be phosphorylated (Betts & Russell, 2003). The porcine SLC15A4 protein sequence was submitted to the NetPhos 3.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) to identify serine phosphorylation sites and serine 273 was predicted to be phosphorylated (prediction score: 0.991). However, we have no indication whether this serine is involved in substrate binding and if its phosphorylation is required for transport activity. Finally, there was no association between SLC15A4 c.658A>G and c.818G>A SNPs and the SLC15A4 mRNA abundance in the *longissimus dorsi* muscle ( $P > 0.10$ ; data not shown).

Associations between SLC15A3 and SLC15A4 diplotypes and studied traits are presented in Table B9. For the SLC15A3 gene, the CT/TT diplotypes is not presented as its frequency across breeds was  $< 0.05$ . Overall significant associations were observed between SLC15A3 diplotypes and fat and moisture content values, and these associations remained significant after the FDR correction ( $P \leq 0.05$ ). Pigs with the CT/CT diplotypes had higher muscle fat content and lower moisture content values when compared with the CC/CC, CC/CT, CC/TT and CT/CC diplotypes ( $P \leq 0.05$ ). There were no associations between SLC15A3 diplotypes and other studied traits (Table B9). SLC15A3 is located on the *Sus scrofa* chromosome 2

(SSC2) within the 10352005..10366583 segment (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=sus+scrofa+slc15a3>). In human, SLC15A3 is positioned on chromosome 11q12.2 (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC15A3>) within a section that extends from ~ 11.7 to 19.2 cM on the corresponding SSC2 genetic map (Vingborg et al., 2009). Although several intramuscular fat content (IMF) quantitative trait loci (QTL) have been identified on chromosome 2 (<http://www.animalgenome.org/QTLdb/app>), none of them is located within or in close proximity to the ~ 11.7 to 19.2 cM section of SSC2.

For the SLC15A4 gene, the AA/GA, AG/GG and GG/AA diplotypes were not included in the association analysis since frequencies were  $< 0.05$ . Pigs with the SLC15A4 AA/GG diplotype had lower color  $b^*$  and drip loss values when compared with AG/GA animals ( $P \leq 0.05$ , Table B9). After correcting for multiple testings, the observed association with drip loss remained significant ( $P \leq 0.05$ ). Tendencies were also found for carnosine content ( $P = 0.069$ ), color  $L^*$  ( $P = 0.058$ ), cooking loss ( $P = 0.077$ ) and glycolytic potential ( $P = 0.077$ ) values. Animals with the AA/GG diplotype tended to have higher muscle carnosine content and lower color  $L^*$ , cooking loss and glycolytic potential when compared with those having the AG/GA diplotype. These results suggest that selection for higher muscle carnosine content, and for improved meat color and water holding capacity, may be achieved by selecting in favour of the SLC15A4 AA/GA diplotype. However, selection for the c.658AA genotype would be easier and more efficient as demonstrated by associations with the same traits (except for pH 24 h), which all remained or tended to be significant after a FDR correction (Table B8). There was no association between SLC15A3 or SLC15A4 diplotypes and the mRNA abundance of the SLC15A3 or SLC15A4 genes in the *longissimus thoracis* muscle ( $P > 0.10$ ; data not shown).



**Table B9. Least square means of anserine and carnosine content and meat quality traits in the *longissimus thoracis* muscle for the SLC15A3 and SLC15A4 diplotypes.**

	SLC15A3 diplotypes <sup>1</sup>						SEM	P-value <sup>2</sup>	SLC15A4 diplotypes <sup>1</sup>		SEM	P-value <sup>2</sup>
	CC/CC	CC/CT	CC/TT	CT/CC	CT/CT	TT/CC			AA/GG	AG/GA		
<i>Anserine and carnosine muscle content</i>												
Frequencies (n)	0.29 (121)	0.17 (71)	0.06 (26)	0.31 (131)	0.08 (36)	0.08 (35)			0.82 (352)	0.13 (56)		
Anserine (mg/100 g muscle)	20.31	19.79	18.89	20.18	19.53	20.63	0.62	0.206	20.12	19.70	0.43	0.363
Carnosine (mg/100 g muscle)	279.28	286.48	282.83	277.45	272.10	280.61	7.12	0.440	280.86	271.11	5.00	<b>0.069</b>
<i>Meat quality parameters</i>												
Frequencies (n)	0.28 (166)	0.16 (96)	0.05 (28)	0.33 (196)	0.08 (48)	0.09 (51)			0.82 (484)	0.14 (85)		
<i>Meat color<sup>3</sup></i>												
Color a*	4.56	4.29	4.57	4.64	4.47	4.55	0.23	0.286	4.53	4.59	0.13	0.705
Color b*	6.70	6.63	6.83	6.83	6.68	6.80	0.21	0.668	6.70	6.97	0.12	<b>0.035</b>
Color L*	51.37	51.91	51.78	51.81	51.61	51.60	0.56	0.655	51.58	52.23	0.32	<b>0.058</b>
<i>Water holding capacity</i>												
Cooking loss (%)	18.61	18.79	18.38	19.03	18.39	18.49	0.36	0.121	18.68	19.10	0.22	<b>0.077</b>
Drip loss (%)	3.38	3.34	3.55	3.41	3.16	3.71	0.43	0.889	3.31	4.06	0.25	<b>0.006†</b>
Freezing loss (%)	8.32	8.42	8.91	8.26	8.40	8.44	0.38	0.733	8.34	8.52	0.23	0.471
<i>Physical and chemical traits</i>												
Fat content (%)	5.13 <sup>b</sup>	5.09 <sup>b</sup>	5.03 <sup>b</sup>	5.09 <sup>b</sup>	5.72 <sup>a</sup>	5.40 <sup>ab</sup>	0.21	<b>0.009†</b>	5.16	5.18	0.13	0.905
Moisture content (%)	72.50 <sup>a</sup>	72.51 <sup>a</sup>	72.83 <sup>a</sup>	72.45 <sup>a</sup>	71.87 <sup>b</sup>	72.28 <sup>ab</sup>	0.21	<b>0.005†</b>	72.46	72.35	0.13	0.418
Protein content (%)	22.10	22.19	21.81	22.13	22.20	22.15	0.13	0.190	22.13	22.06	0.08	0.405
pH 24 h	5.63	5.64	5.62	5.62	5.62	5.61	0.02	0.605	5.63	5.60	0.01	0.127
Shear force (kg)	2.70	2.67	2.66	2.72	2.73	2.66	0.10	0.940	2.71	2.66	0.06	0.452
Glycolytic potential <sup>4</sup>	158.83	163.72	160.04	161.59	165.73	162.84	5.57	0.682	160.73	167.10	3.33	<b>0.077</b>

<sup>1</sup>For each diplotype, different lower case letters within row differ at  $P \leq 0.05$  after a Tukey adjustment. The CT/TT diplotype (for *SLC15A3*) and the AA/GA, AG/GG and GG/AA diplotypes (for *SLC15A4*) are not presented in this table as their frequencies were below 0.05.

<sup>2</sup>P-value, probability of the F test for diplotype effect on studied traits; Significant P-values and tendencies are indicated in bold. †, Significant effect after FRD correction for trait-wise multiple testing.

<sup>3</sup>Color a\*, b\* and L\* are estimated with a Minolta Chroma Meter CR-300 colorimeter.

<sup>4</sup>Glycolytic potential ( $\mu\text{mol}$  of lactate eq/g tissue).

SLC15A4 is located on the *Sus scrofa* chromosome 14 (SSC14) within the 27770845..27803186 segment (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=sus+scrofa+slc15a4>). In human, SLC15A4 is located on chromosome 12q24.32 (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC15A4>) and lies within a section that extends from ~ 36 to 54 cM on the corresponding SSC14 genetic map (Vingborg et al., 2009). Interestingly, several meat quality QTLs have been identified in that specific segment of SSC14 (<http://www.animalgenome.org/QTLdb/app>). For example, QTLs were identified for meat color b\* (Harmegnies et al., 2006; Ponsuksili, Murani, Trakooljul, Schwerin & Wimmers, 2014), color L\* (Li et al., 2010), cooking loss (Malek et al., 2001) and drip loss (Kim et al., 2011) traits. Therefore, the observed associations between SLC15A4 SNPs and these meat quality traits may be due to SLC15A4 variant alleles or it could be explained by the close proximity of previously reported QTLs, which include other potential candidate genes.

### 3.5.5. Conclusions

In this study, animals with the SLC15A4 c.658AA genotype or AA/GG diplotype had higher muscle carnosine content, along with improved meat quality attributes such as better water holding capacity and reduced yellowness (color b\*). Interestingly, the relationship between muscle carnosine content and meat quality parameters was recently reported in pigs (D'Astous-Pagé et al., 2016), with better pork quality attributes being observed in pigs with higher muscle carnosine content. Although the c.\*35C>T and c.\*52C>T SNPs were found in microRNA consensus sequences, they had no effect on SLC15A3 mRNA abundance and on muscle carnosine content. Therefore the most promising associations are those reported for SLC15A4. Indeed, the presence of previously identified QTLs for drip loss, cooking loss, color b\* and color L\* traits in close proximity to the porcine SLC15A4 gene and, the observed associations between the c.658A>G SNP and these same meat quality parameters,

suggest that selection in favor of SLC15A4 specific alleles might positively affect pork meat quality attributes. Although muscle carnosine content is increased for pigs with the SLC15A4 c.658AA genotype or AA/GG diplotype, additional functional studies are needed before being able to characterize the effect of these polymorphisms on carnosine transport activity. Finally, further work is needed with a larger number of animals before being able to use some of the SLC15A4 SNPs in selection programs.

### **3.5.6. Acknowledgements**

This work was financially supported by Agriculture and Agri-Food Canada, Swine Innovation Porc, Canada Pork International, Canadian Pork Council, le Centre de développement du porc du Québec and the Canadian Centre for Swine Improvement (Grant number J-000383). The authors want to thank Danièle Beaudry and Hélène Groutsch for technical assistance, the technicians from the Deschambault test station for animal care and collection of data and, Aliments ASTA Inc. (Saint-Alexandre-de-Kamouraska, QC, Canada) for their invaluable help with tissue collection.

### 3.5.7. References

- Baguet, A., Everaert, I., Achten, E., Thomis, M., & Derave, W. (2012). The influence of sex, age and heritability on human skeletal muscle carnosine content. *Amino Acids*, *43*, 13-20.
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B. (Methodological)*, *57*, 289–300.
- Betts, M. J., & Russell, R. B. (2003). Amino acid properties and consequences of substitutions. In *Bioinformatics for Geneticists* (Chapter 14). Ed. Michael R. Barnes and Ian C. Gray. J. John Wiley & Sons, Ltd. NJ. USA. pp. 289-316.
- Boldyrev, A. A., Aldini, G., & Derave, W. (2013). Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiological Reviews*, *93*, 1803-1845.
- Canadian Council on Animal Care Guidelines (CCAC) (2009). The care and use of farm animals in research, teaching and testing, CCAC, Ottawa, Ontario, Canada.
- D'Astous-Pagé, J., Gariépy, C., Blouin, R., Cliche, S., Sullivan, B., Fortin, F., & Palin, M. F. (2016). Carnosine content in the porcine *longissimus thoracis* muscle and its association with meat quality attributes and carnosine-related genes expression. Submitted to Meat Science.
- Drozak, J., Veiga-da-Cunha, M., Vertommen, D., Stroobant V., & Van Schaftingen, E. (2010). Molecular identification of carnosine synthase as ATP-grasp domain-containing protein 1 (ATPGD1). *Journal of Biological Chemistry*, *285*, 9346-9356.
- Everaert, I., De Naeyer, H., Taes, Y., & Derave, W. (2013). Gene expression of carnosine-related enzymes and transporters in skeletal muscle. *European Journal of Applied Physiology*, *113*, 1169-1179.

- Harmegnies, N., Davin, F., De Smet, S., Buys, N., Georges, M., & Coppeters, W. (2006). Results of a whole-genome quantitative trait locus scan for growth, carcass composition and meat quality in a porcine four-way cross. *Animal Genetics*, *37*, 543-553.
- Harris, R. C., Wise, J. A., Price, K. A., Kim, H. J., Kim, C. K., & Sale, C. (2012). Determinants of muscle carnosine content. *Amino Acids*, *43*, 5-12.
- Hipkiss, A. R. (2009). Carnosine and its possible roles in nutrition and health. *Advances in Food and Nutrition Research*, *57*, 87-154.
- Kilic, F., Murphy, D. L., & Rudnick, G. (2003). A human serotonin transporter mutation causes constitutive activation of transport activity. *Molecular Pharmacology*, *64*, 440-446.
- Kim, S. W., Li, X. P., Lee, Y. M., Cho, B. W., Choi, B. H., et al. (2011). QTL scan for meat quality traits using high-density SNP chip analysis in cross between Korean native pig and Yorkshire. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *24*, 1184-1191.
- Labrecque, B., Beaudry, D., Mayhue, M., Hallé, C., Bordignon, V., Murphy, B. D., et al. (2009). Molecular characterization and expression analysis of the porcine paraoxonase 3 (PON3) gene. *Gene*, *443*, 110-120.
- Lee, S. H., Chang, M. Y., Lee, K. H., Park, B. S., Lee, Y. S., Chin, H. R., et al. (2000). Importance of valine at position 152 for the substrate transport and 2 $\beta$ -carbomethoxy-3 $\beta$ -(4-fluorophenyl)tropane binding of dopamine transporter. *Molecular Pharmacology*, *57*, 883-889.
- Li, H. D., Lund, M. S., Christensen, O. F., Gregersen, V. R., Henckel, P. & Bendixen, C. (2010). Quantitative trait loci analysis of swine meat quality traits. *Journal of Animal Science*, *88*, 2904-2912.
- Li, L., He, M., Zhou, L., Miao, X., Wu, F., Huang, S., et al. (2015). A solute carrier family 22 member 3 variant rs3088442 G $\rightarrow$ A associated with coronary heart disease inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response. *Journal of Biological Chemistry*, *290*, 5328-5340.

- Ma, X. Y., Jiang, Z. Y., Lin, Y. C., Zheng, C. T., & Zhou, G. L. (2010). Dietary supplementation with carnosine improves antioxidant capacity and meat quality of finishing pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *94*, e286-e295.
- Malek, M., Dekkers, J. C. M., Lee, H. K., Baas, T. J., Prusa, K. & Huff-Lonergan, E. (2001). A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. II. Meat and muscle composition. *Mammalian Genome*, *12*, 637-645.
- Manolescu, A., Salas-Burgos, A. M., Fischbarg, J., & Cheeseman, C. I. (2005). Identification of a hydrophobic residue as a key determinant of fructose transport by the facilitative hexose transporter SLC2A7 (GLUT7). *Journal of Biological Chemistry*, *280*, 42978-42983.
- Mateescu, R. G., Garmyn, A. J., O'neil, M. A., Tait, R. G., Abuzaid, A., Mayes, M. S., et al. (2012). Genetic parameters for carnitine, creatine, creatinine, carnosine, and anserine concentration in *longissimus* muscle and their association with palatability traits in Angus cattle. *Journal of Animal Science*, *90*, 4248-4255.
- Mora, L., Sentandreu, M. Á., & Toldrá, F. (2008). Contents of creatine, creatinine and carnosine in porcine muscles of different metabolic types. *Meat Science*, *79*, 709-715.
- Ponsuksili, S., Murani, E., Trakooljul, N., Schwerin, M., & Wimmers, K. (2014). Discovery of candidate genes for muscle traits based on GWAS supported by eQTL-analysis. *International Journal of Biological Sciences*, *10*, 327-337.
- Shen, G. Q., Abdullah, K. G., & Wang, Q. K. (2009). The TaqMan method for SNP genotyping. *Methods in Molecular Biology*. *578*, 293-306.
- Stephens, M., & Scheet, P. (2005). Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *American Journal of Human Genetics*, *76*, 449-462.
- Stephens, M., Smith, N. J., & Donnelly, P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*, *68*, 978-989.

- Straadt, I. K., Aaslyng, M. D., & Bertram, H. C. (2014). An NMR-based metabolomics study of pork from different crossbreeds and relation to sensory perception. *Meat Science*, *96*, 719-728.
- Vingborg, R. K. K., Gregersen, V. R., Zhan, B., Panitz, F., Hoj, A., & Sorensen, K. K. (2009). A robust linkage map of the porcine autosomes based on gene-associated SNPs. *BMC Genomics*, *10*, 134.
- Vosa, U., Esko, T., Kasela, S., & Annilo, T. (2015). Altered gene expression associated with microRNA binding site polymorphisms. *PLOS ONE*, *10*(10), e0141351.
- Yamashita, T., Shimada, S., Guo, W., Sato, K., Kohmura, E., Hayakawa, T., et al. (1997). Cloning and functional expression of a brain peptide/histidine transporter. *Journal of Biological Chemistry*, *272*, 10205-10211.
- Yang, P., Hao, Y., Feng, J., Lin, H., Feng, Y., Wu, X., et al. (2014). The expression of carnosine and its effect on the antioxidant capacity of *longissimus dorsi* muscle in finishing pigs exposed to constant heat stress. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *27*, 1763-1772.
- Zuo, L., Wang, K., & Luo, X. (2014). Use of diplotypes – matched haplotype pairs from homologous chromosomes – in gene-disease association studies. *Shanghai Archives of Psychiatry*, *26*, 165-170.

## CHAPITRE 4

### DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Pour demeurer compétitive, l'industrie porcine canadienne se doit d'être innovante afin de se distinguer des autres produits carnés. Une amélioration de la perception positive des consommateurs envers la viande de porc serait possible en rehaussant la qualité finale du produit et en augmentant la valeur nutritive de la viande de porc (ex. en augmentant la carnosine musculaire). De récentes études ont démontré que la carnosine peut inhiber la glycation non enzymatique des protéines, qu'elle agit comme un tampon de pH et qu'elle présente des propriétés antioxydantes (Boldyrev et al., 2013). Ces propriétés physiologiques lui ont valu une réputation de molécule « anti-âge ». Ce projet de maîtrise est la première étape d'un programme de recherche plus vaste visant à améliorer la qualité de la viande de porc ainsi que sa valeur nutritive via l'augmentation de la carnosine musculaire. Ce projet de maîtrise comporte deux parties distinctes. Dans un premier temps, nous avons émis l'hypothèse que l'expression de gènes reliés au métabolisme de la carnosine pourrait être associée au dépôt de carnosine musculaire et que de hauts niveaux en carnosine musculaire seraient liés à de meilleurs paramètres de qualité de la viande chez le porc en croissance. Dans un deuxième temps, nous avons émis l'hypothèse que des SNPs présents dans les gènes liés au métabolisme de la carnosine pourraient influencer les niveaux de carnosine musculaire et différents paramètres de qualité de la viande chez le porc en croissance.

L'objectif premier de mon projet de maîtrise était de caractériser les niveaux de carnosine musculaire ainsi que l'expression de gènes liés au métabolisme de la carnosine dans le muscle *longissimus thoracis* de porcs de race pure (Duroc, Landrace, Yorkshire). Nos résultats démontrent que les porcs de race Duroc présentent une quantité plus élevée de carnosine musculaire que les porcs de race Landrace et Yorkshire (Figure A1). Il serait donc



avantageux d'utiliser les porcs de race Duroc en croisements terminaux afin d'augmenter la quantité de carnosine musculaire. Cependant, les mâles Duroc sont déjà majoritairement utilisés au Canada et ils sont croisés à des femelles Landrace x Yorkshire pour produire le porc de consommation. Ces résultats pourraient néanmoins être d'intérêt pour le marché Européen où la race Duroc est très peu utilisée en croisement terminal. Les niveaux de carnosine musculaire mesurés dans cette étude sont similaires à ceux précédemment rapportés pour le porc (Aristoy & Toldrá, 1998; Hipkiss, 2009; Mora et al., 2008). Nous avons également observé de fortes variations interindividuelles dans la concentration de carnosine musculaire ce qui suggère une influence possible du bagage génétique de l'animal. De plus, nous avons pu observer, pour la première fois, la présence de transcrits pour différents gènes liés au métabolisme de la carnosine (i.e. CNDP2, SLC6A6, SLC15A3, SLC15A4 et SLC36A1) et confirmer la présence de la CARNS1 dans le muscle *longissimus thoracis* porcin. Des niveaux plus élevés du transcrit de la CARNS1 ont été observés chez les porcs Duroc, comparativement aux porcs de race Landrace et Yorkshire (Figure A3). Ces résultats suggèrent que l'augmentation de carnosine musculaire observée chez les porcs de race Duroc serait liée à une augmentation des niveaux d'expression génique de la CARNS1, l'enzyme responsable de la synthèse de la carnosine.

Le second objectif était de vérifier si les niveaux d'expression génique observés, pour les gènes sélectionnés, sont associés à la quantité de carnosine musculaire mesurée chez le porc. Pour évaluer cet effet nous avons regroupé les porcs en trois catégories selon le niveau de carnosine musculaire (bas, moyen et haut) pour chacune des races. Nos résultats démontrent un lien entre le contenu en carnosine musculaire et l'expression des gènes CARNS1, SLC15A3 et SLC15A4 chez les Duroc. Pour cette même race, les porcs ayant une teneur élevée en carnosine musculaire (groupe haut) présentent une plus faible expression génique de la CARNS1 en comparaison avec les deux autres groupes (bas et moyen; Figure A4a). Une observation similaire a été rapportée chez la souris (Everaert et al., 2013) et les auteurs de cette étude suggèrent que la carnosine pourrait agir comme un inhibiteur compétitif de sa

propre synthèse. Cependant, lorsque les souris reçoivent un supplément de  $\beta$ -alanine, une augmentation de la carnosine musculaire et de l'abondance du transcrite de la *CARNS1* sont alors observés (Everaert et al., 2013), suggérant ainsi que l'ajout de  $\beta$ -alanine à la diète favoriserait la synthèse de carnosine. Il serait donc intéressant d'évaluer si une supplémentation en  $\beta$ -alanine pourrait entraîner une augmentation des niveaux de carnosine musculaire chez le porc en croissance, et ainsi améliorer la qualité de la viande. Dans ce projet de maîtrise, nous avons basé notre choix des gènes à l'étude sur des travaux antérieurs effectués chez la souris et l'humain. Nos résultats démontrent cependant qu'il existe des différences d'expression pour certains de ces gènes (ex. *ABAT*, *HDC*) entre le porc, la souris et l'humain (Table A1). Il serait donc possible que d'autres enzymes ou transporteurs soient impliqués dans le métabolisme de la carnosine chez le porc. Il serait alors intéressant d'effectuer une étude transcriptomique afin d'identifier les gènes qui seraient modulés dans les muscles squelettiques, suite à une supplémentation de  $\beta$ -alanine ou de carnosine chez des porcs en croissance. Toujours pour les porcs de race Duroc, nous avons observé que le groupe ayant de haut taux de carnosine musculaire présentait des niveaux d'expression génique plus élevés pour les gènes *SLC15A3* et *SLC15A4* (Figure A4a). Un profil d'expression similaire a été observé chez les Landrace pour le gène *SLC15A4*. Les gènes *SLC15A3* et *SLC15A4* étant impliqués dans le transport de la carnosine, ces résultats suggèrent que la carnosine pourrait réguler positivement la transcription de *SLC15A3* et *SLC15A4* pour ainsi assurer son propre transport (Figure A4b). Enfin, nos résultats suggèrent une contribution limitée des gènes *CNDP2*, *SLC6A6* et *SLC36A1* dans le dépôt de la carnosine musculaire chez le porc.

Le troisième objectif visait à déterminer si les niveaux de carnosine musculaire sont associés à différents paramètres de qualité de la viande chez le porc. Nos résultats démontrent qu'un haut niveau de carnosine musculaire est associé à une amélioration de différents caractères de la qualité de la viande (i.e. couleur, rétention d'eau et pH; Tableau A4) chez le porc. Ces effets positifs sont plus marqués chez les Duroc, la race ayant les niveaux de carnosine les plus élevés. Ces résultats suggèrent que la probabilité d'observer une amélioration de la

qualité de la viande chez le porc pourrait être liée à l'atteinte d'un certain seuil de carnosine musculaire. Afin d'améliorer la qualité du produit, il serait donc avantageux pour les producteurs et transformateurs d'augmenter les niveaux de carnosine chez le porc.

Notre quatrième objectif visait à identifier la présence de SNPs dans certains gènes du métabolisme de la carnosine (CARNS1, SLC6A6, SLC15A3 et SLC15A4) et à déterminer si les différents allèles observés sont associés aux variations de carnosine musculaire, de même qu'aux valeurs de différents paramètres de qualité de la viande. Le séquençage des régions codantes et 3' non traduites (i.e. 3' UTR) de ces gènes nous a permis d'identifier 27 SNPs différents, dont quatre ont été conservés pour effectuer des analyses d'association (Tableau B4). Pour le gène SLC15A4, le SNP c.658A>G entraîne le changement d'une isoleucine pour une valine et le SNP c.818G>A correspond à la modification d'une sérine pour une asparagine. Pour le gène SLC15A3, tous les SNP détectés dans la séquence codante sont des mutations silencieuses. Deux mutations ont été identifiées dans la région 3' UTR (c.\*35C>T and c.\*52C>T) de ce gène, lesquelles sont situées à l'intérieur d'une séquence consensus reconnue par un micro-ARN. Les micro-ARN sont impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle de plusieurs gènes et peuvent donc affecter la stabilité des ARNm. Par contre, les mutations c.\*35C>T and c.\*52C>T observées dans le gène SLC15A3 ne semblent pas avoir d'effet sur l'expression génique et sur le contenu en carnosine musculaire (Tableau B7). Les analyses d'association ont permis de démontrer que les porcs ayant le génotype SLC15A4 c.658AA présentent une augmentation de la carnosine musculaire et une amélioration de différents paramètres associés à la qualité de la viande (ex. couleur, pH, perte en eau à la cuisson; Tableau B8). Il serait donc avantageux de sélectionner les porcs ayant ce génotype. Cependant l'analyse des fréquences génotypiques nous indique que la majorité des porcs Duroc et Landrace utilisés dans cette étude possèdent déjà l'allèle bénéfique. Néanmoins, une amélioration génétique serait envisageable pour les porcs de race Yorkshire, lesquels présentent une fréquence plus faible du génotype SLC15A4 c.658AA. La faible fréquence de certains allèles limite l'interprétation de quelques résultats et il serait intéressant

de confirmer nos résultats d'association sur une nouvelle population et avec plus d'animaux. Les SNPs c.658A>G et c.818G>A, observés dans le gène SLC5A4, sont localisés dans des régions chromosomales où des locus de caractères quantitatifs (quantitative trait loci ou QTL) ont été rapportés en lien avec différents caractères de qualité de la viande (Li et al., 2010; Malek et al., 2001). D'autres gènes localisés à l'intérieur ou à proximité de ces locus pourraient être responsables des effets positifs observés sur la quantité de carnosine musculaire et sur la qualité de la viande. Dans cette éventualité, les SNPs c.658A>G et c.818G>A ne seraient pas identifiés en tant que mutations causales mais pourraient tout de même être utilisés comme marqueurs moléculaires en sélection porcine.

Enfin, le cinquième objectif visait à mesurer l'expression des gènes CARNS1, CNDP2, SLC6A6, SLC15A3, SLC15A4 et SLC36A1 dans différents tissus porcins afin de déterminer quels tissus seraient en mesure de synthétiser et dégrader la carnosine et de transporter la carnosine et ses précurseurs chez le porc. Les résultats de la distribution tissulaire ont démontré que les gènes précédemment détectés dans le muscle *longissimus thoracis* porcine sont également exprimés dans tous les tissus testés (cerveau, duodénum, estomac, foie, gras dorsal, poumon et reins). Pour le gène CARNS1, les valeurs d'expression génique les plus élevées ont été observées dans le muscle *longissimus thoracis* en comparaison avec son expression dans le duodénum, le rein, le poumon, le gras dorsal et l'estomac (Figure A2a). Pour le gène CNDP2, les valeurs d'expression génique les plus basses sont observés dans le *longissimus thoracis* en comparaison avec les tissus du cerveau, du duodénum, des reins, du foie et du poumon (Figure A2b). Ces résultats étaient attendus puisque le muscle présente les valeurs les plus élevées en carnosine musculaire et l'activité de la carnosinase (CNDP2) y est minimale, tel que démontré par la très lente diminution de carnosine musculaire suite à l'arrêt d'une supplémentation en  $\beta$ -alanine (Sale et al., 2013; Teufel et al., 2003). Les transcrits des transporteurs SLC6A6, SLC15A3 et SLC15A4 sont observés dans tous les tissus étudiés, ce qui suggère que la carnosine et ses précurseurs ( $\beta$ -alanine et L-histidine) peuvent être dirigés

vers ces tissus ou encore être sécrétés par ces tissus. Le muscle squelettique est cependant considéré comme le tissu pouvant emmagasiner le plus de carnosine.

En conclusion, les résultats de ce projet de maîtrise démontrent qu'il serait avantageux pour les producteurs et transformateurs d'augmenter les niveaux de carnosine musculaire chez le porc en croissance. En plus de présenter une valeur ajoutée à la viande de porc (attribut santé), des niveaux plus élevés de carnosine musculaire pourraient améliorer la couleur et diminuer les pertes en eau. Les travaux de ce mémoire ont été effectués sur des porcs de races pures. Il serait aussi intéressant d'effectuer des études supplémentaires en utilisant des porcs hybrides Duroc x Landrace-Yorkshire, lesquels sont majoritairement utilisés comme porcs terminaux pour produire la viande retrouvée en épicerie. Il serait également intéressant de déterminer si une supplémentation alimentaire en  $\beta$ -alanine ou en carnosine pourrait augmenter les niveaux de carnosine musculaire et, du même coup, contribuer à diminuer la grande variabilité interindividuelle observée dans cette étude pour les niveaux de carnosine musculaire. Enfin, les résultats obtenus pour les SNPs identifiés sur le gène SLC15A4 démontrent que certains allèles sont associés à des niveaux plus élevés de carnosine musculaire et à une meilleure qualité de la viande. Cependant, des travaux additionnels sont nécessaires sur une plus grande population avant d'utiliser cette information dans un programme de sélection.

## BIBLIOGRAPHIE

- Aloisi, A., Barca, A., Romano, A., Guerrieri, S., Storelli, C., Rinaldi, R., & Verri, T. (2013). Anti-aggregating effect of the naturally occurring dipeptide carnosine on AB1-42 fibril formation. *PLoS ONE*, *8*(7).
- Anderson, C. M. H., Howard, A., Walters, J. R. F., Ganapathy, V., & Thwaites, D. T. (2009). Taurine uptake across the human intestinal brush-border membrane is via two transporters: H<sup>+</sup>-coupled PAT1 (SLC36A1) and Na<sup>+</sup>- and Cl<sup>-</sup>-dependent TauT (SLC6A6). *The Journal of Physiology*, *587*, 731–744.
- Aristoy, M. C., & Toldrá, F. (1998). Concentration of free amino acids and dipeptides in porcine skeletal muscles with different oxidative patterns. *Meat Science*, *50*(3), 327–332.
- Aristoy, M. C., & Toldrá, F. (2004). Histidine dipeptides HPLC-based test for the detection of mammalian origin proteins in feeds for ruminants. *Meat Science*, *67*(2), 211–217.
- Baguet, A., Everaert, I., Achten, E., Thomis, M., & Derave, W. (2012). The influence of sex, age and heritability on human skeletal muscle carnosine content. *Amino Acids*, *43*(1), 13–20.
- Bao, Y., Gao, C., Hao, W., Ji, C., Zhao, L., Zhang, J., Liu, T., & Ma, Q. (2015). Effects of dietary L-carnosine and dlpha-lipoic acid on growth performance, blood thyroid hormones and lipid profiles in finishing pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *28*(10), 1465–1470.
- Bauchart, C., Savary-Auzeloux, I., Mirand, P. P., Thomas, E., Morzel, M., & Rémond, D. (2007). Carnosine concentration of ingested meat affects carnosine net release into the portal vein of minipigs. *The Journal of Nutrition*, *137*(3), 589–593.
- Begum, G., Cunliffe, A., & Leveritt, M. (2005). Physiological role of carnosine in contracting muscle. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, *15*(5), 493–514.
- Boldyrev, A., Aldini, G., & Derave, W. (2013). Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiological Reviews*, *93*(4), 1803–1845.
- Boldyrev, A., Fedorova, T., Stepanova, M., Dobrotvorskaya, I., Kozlova, E., Boldanova, N., Bagyeva, G., Ivanova-Smolenskaya, I., & Illarioshkin, S. (2008). Carnosine increases efficiency of DOPA therapy of Parkinson's disease: a pilot study. *Rejuvenation Research*, *11*(4), 821–827.
- Botka, C. W., Wittig, T. W., Graul, R. C., Nielsen, C. U., Higaka, K., Amidon, G. L., Sadée, W., Higaki, K., & Amidon, G. L. (2000). Human proton/oligopeptide transporter (POT) genes: identification of putative human genes using bioinformatics. *AAPS PharmSci*, *2*(2), 76–97.

Cheng, J. H., Wang, S. T., & Ockerman, H. W. (2013). Quality preservation of reduced sodium pork patties: effects of antioxidants on colour and lipid stability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *93*(12), 2959–2962.

Cheng, J.-H., Wang, S.-T., & Ockerman, H. W. (2007). Lipid oxidation and color change of salted pork patties. *Meat Science*, *75*(1), 71–77.

Cornet, M., & Bousset, J. (1999). Free amino acids and dipeptides in porcine muscles: differences between red and white muscles. *Meat Science*, *51*(3), 215–219.

Decker, E. A., & Crum, A. D. (1993). Antioxidant activity of carnosine in cooked ground pork. *Meat Science*, *34*(2), 245–253.

Derave, W., Everaert, I., Beeckman, S., & Baguet, A. (2010). Muscle carnosine metabolism and B-alanine supplementation in relation to exercise and training. *Sports Medicine*, *40*(3), 247–263.

Drozak, J., Chrobok, L., Poleszak, O., Jagielski, A. K., & Derlacz, R. (2013). Molecular identification of carnosine N-methyltransferase as chicken histamine N-methyltransferase-like protein (hnmt-like). *PloS One*, *8*(5), e64805.

Drozak, J., Veiga-da-Cunha, M., Vertommen, D., Stroobant, V., & Van Schaftingen, E. (2010). Molecular identification of carnosine synthase as ATP-grasp domain-containing protein 1 (ATPGD1). *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(13), 9346–9356.

Dutka, T. L., Lamboley, C. R., McKenna, M. J., Murphy, R. M., & Lamb, G. D. (2012). Effects of carnosine on contractile apparatus Ca<sup>2+</sup> sensitivity and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release in human skeletal muscle fibers. *Journal of Applied Physiology*, *112*(5), 728–736.

Everaert, I., De Naeyer, H., Taes, Y., & Derave, W. (2013). Gene expression of carnosine-related enzymes and transporters in skeletal muscle. *European Journal of Applied Physiology*, *113*(5), 1169–1179.

Everaert, I., Mooyaart, A., Baguet, A., Zutinic, A., Baelde, H., Achten, E., Taes, Y., De Heer, E., & Derave, W. (2011). Vegetarianism, female gender and increasing age, but not CNBP1 genotype, are associated with reduced muscle carnosine levels in humans. *Amino Acids*, *40*(4), 1221–1229.

Gardner, M. L. G., Illingworth, K. M., Kelleher, J., & Wood, D. (1991). Intestinal absorption of the intact peptide carnosine in man, and comparison with intestinal permeability to lactulose. *Journal of Physiology*, *439*, 411.

Gordon, a M., Homsher, E., Regnier, M., Physiol, A. J., Integrative, R., & Physiol, C. (2000). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiological Reviews*, *80*(2), 853–924.

Gougeon, P. (2012). Production d'éthanol: des impacts majeurs pour les agriculteurs. *Porc*

Québec, 55–56.

Grillo, M. A., & Colombatto, S. (2008). Advanced glycation end-products (AGEs): Involvement in aging and in neurodegenerative diseases. *Amino Acids*, 35(1), 29–36.

Gulewitch, W., & Amdiradzhibi, S. (1900). Über das Carnosin, eine neue organische Base des Fleischextraktes. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 33, 1902–1903.

Haas, H. L., Sergeeva, O. A., & Selbach, O. (2008). Histamine in the nervous system. *Physiological Reviews*, 88(3), 1183–1241.

Harris, R. C., Jones, G., Hill, C. A., Kendrick, I. P., Boobis, L., Kim, C., Kim, H., Dang, V. H., Edge, J., & Wise, J. A. (2007). The carnosine content of V Lateralis in vegetarians and omnivores. *The FASEB Journal*, 21(6), A944.

Harris, R. C., Kim, H. J., Kim, C. K., Kendrick, I. P., Price, K. A., & Wise, J. A. (2010). Simultaneous changes in muscle carnosine and taurine during and following supplementation with B-alanine. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 42(5), 107.

Harris, R. C., Marlin, D. J., Dunnett, M., Snow, D. H., & Hultman, E. (1990). Muscle buffering capacity and dipeptide content in the thoroughbred horse, greyhound dog and man. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 97(2), 249–251.

Harris, R. C., & Stellingwerff, T. (2013). Effect of beta-alanine supplementation on high-intensity exercise performance. *Limits of Human Endurance*, 76, 61–71.

Harris, R. C., Tallon, M. J., Dunnett, M., Boobis, L., Coakley, J., Kim, H. J., Fallowfield, J. L., Hill, C. A., Sale, C., & Wise, J. A. (2006). The absorption of orally supplied B-alanine and its effect on muscle carnosine synthesis in human vastus lateralis. *Amino Acids*, 30(3), 279–289.

Harris, R. C., Wise, J. A., Price, K. A., Kim, H. J., Kim, C. K., & Sale, C. (2012). Determinants of muscle carnosine content. *Amino Acids*, 43(1), 5–12.

Hill, C. A., Harris, R. C., Kim, H. J., Harris, B. D., Sale, C., Boobis, L. H., Kim, C. K., & Wise, J. A. (2007). Influence of B-alanine supplementation on skeletal muscle carnosine concentrations and high intensity cycling capacity. *Amino Acids*, 32(2), 225–233.

Hipkiss, A. R. (2005). Glycation, ageing and carnosine: Are carnivorous diets beneficial? *Mechanisms of Ageing and Development*, 126(10), 1034–1039.

Hipkiss, A. R. (2009). Carnosine and its possible roles in nutrition and health. *Advances in Food and Nutrition Research*, 57, 87–154.

Hipkiss, A. R. (2014). Aging risk factors and Parkinson's disease: Contrasting roles of common dietary constituents. *Neurobiology of Aging*, 35(6), 1469–1472.

Holliday, R., & McFarland, G. A. (1996). Inhibition of the growth of transformed and



neoplastic cells by the dipeptide carnosine. *British Journal of Cancer*, 73(8), 966.

Horii, Y., Shen, J., Fujisaki, Y., Yoshida, K., & Nagai, K. (2012). Effects of L-carnosine on splenic sympathetic nerve activity and tumor proliferation. *Neuroscience Letters*, 510(1), 1–5.

Ito, T., Oishi, S., Takai, M., Kimura, Y., Uozumi, Y., Fujio, Y., Schaffer, S. W., & Azuma, J. (2010). Cardiac and skeletal muscle abnormality in taurine transporter-knockout mice. *Journal of Biomedical Science*, 17(1), 1.

Jappard, D., Hu, Y., Keep, R. F., & Smith, D. E. (2009). Transport mechanisms of carnosine in SKPT cells: Contribution of apical and basolateral membrane transporters. *Pharmaceutical Research*, 26(1), 172–181.

Kalyankar, G. D., & Meister, A. (1959). Enzymatic synthesis of carnosine from B-alanyl adenylate and histidine. *Journal of the American Chemical Society*, 81(6), 1515–1516.

Kang, J. H., & Kim, K. S. (2003). Enhanced oligomerization of the alpha-synuclein mutant by the Cu, Zn-superoxide dismutase and hydrogen peroxide system. *Molecules and Cells*, 15(1), 87–93.

Kendrick, I. P., Kim, H. J., Harris, R. C., Kim, C. K., Dang, V. H., Lam, T. Q., Bui, T. T., & Wise, J. A. (2009). The effect of 4 weeks B-alanine supplementation and isokinetic training on carnosine concentrations in type I and II human skeletal muscle fibres. *European Journal of Applied Physiology*, 106(1), 131–138.

Kim, H. J., Cho, J., Kim, C. K., Harris, R. C., Harris, D. B., Sale, C., & Wise, J. A. (2005). Effect on muscle fibre morphology and carnosine content after 12 days training of Korean speed skaters. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 37(5), S192.

Kopec, W., Jamroz, D., Wiliczekiewicz, A., Biazik, E., Hikawczuk, T., Skiba, T., Pudlo, A., & Orda, J. (2013). Antioxidation status and histidine dipeptides content in broiler blood and muscles depending on protein sources in feed. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97(3), 586–598.

Krajcovicová-Kudláčková, M., Sebeková, K., Schinzel, R., & Klvanová, J. (2002). Advanced glycation end products and nutrition. *Physiological Research*, 51(3), 313–316.

Lee, Y. T., Hsu, C. C., Lin, M. H., Liu, K. Sen, & Yin, M. C. (2005). Histidine and carnosine delay diabetic deterioration in mice and protect human low density lipoprotein against oxidation and glycation. *European Journal of Pharmacology*, 513(1-2), 145–150.

Lefaucheur, L. (2010). A second look into fibre typing–relation to meat quality. *Meat Science*, 84(2), 257–270.

Lenney, J. F., George, R. P., Weiss, A. M., Kucera, C. M., Chan, P. W. H., & Rinzler, G. S. (1982). Human serum carnosinase: characterization, distinction from cellular carnosinase, and activation by cadmium. *Clinica Chimica Acta*, 123(3), 221–231.

- Li, H. D., Lund, M. S., Christensen, O. F., Gregersen, V. R., Henckel, P., & Bendixen, C. (2010). Quantitative trait loci analysis of swine meat quality traits. *Journal of Animal Science*, *88*(9), 2904–2912.
- Ma, X. Y., Jiang, Z. Y., Lin, Y. C., Zheng, C. T., & Zhou, G. L. (2010). Dietary supplementation with carnosine improves antioxidant capacity and meat quality of finishing pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *94*(6), e286–295.
- Mabry, J., & Baas, T. (1998). The impact of genetics on pork quality (Revised). *National Pork Board*, 1–12.
- Malek, M., Dekkers, J. C. M., Lee, H. K., Baas, T. J., Prusa, K., Huff-Lonergan, E., & Rothschild, M. F. (2001). A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. II. Meat and muscle composition. *Mammalian Genome*, *12*(8), 637–645.
- Mannion, A. F., Jakeman, P. M., Dunnett, M., Harris, R. C., P.L.T., W., Sciences, E., Trust, A. H., & Biology, S. (1992). Carnosine and anserine concentrations in the quadriceps femoris muscle of healthy humans. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, *64*(1), 47–50.
- MAPAQ. (2016). Monographie de l'industrie du porc au Québec. *Publications du gouvernement du Québec*, 1–47.
- Mateescu, R. G., Garmyn, A. J., O'neil, M. A., Tait, R. G., Abuzaid, A., Mayes, M. S., Garrick, D. J., Van Eenennaam, A. L., VanOverbeke, D. L., Hilton, G. G., & Beitz, D. C. (2012). Genetic parameters for carnitine, creatine, creatinine, carnosine, and anserine concentration in longissimus muscle and their association with palatability traits in Angus cattle. *Journal of Animal Science*, *90*(12), 4248–4255.
- Mei, L., Cromwell, G. L., Crum, A. D., & Decker, E. A. (1998). Influence of dietary B-alanine and histidine on the oxidative stability of pork. *Meat Science*, *49*(1), 55–64.
- Mero, A. A., Hirvonen, P., Saarela, J., Hulmi, J. J., Hoffman, J. R., & Stout, J. R. (2013). Effect of sodium bicarbonate and beta-alanine supplementation on maximal sprint swimming. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, *10*(1), 52.
- Mora, L., Sentandreu, M. A., & Toldrá, F. (2008). Contents of creatine, creatinine and carnosine in porcine muscles of different metabolic types. *Meat Science*, *79*(4), 709–715.
- Münch, G., Westcott, B., Menini, T., & Gugliucci, A. (2012). Advanced glycation endproducts and their pathogenic roles in neurological disorders. *Amino Acids*, *42*(4), 1221–1236.
- Nagai, K., Niiijima, A., Yamano, T., Otani, H., Okumra, N., Tsuruoka, N., Nakai, M., & Kiso, Y. (2003). Possible role of L-carnosine in the regulation of blood glucose through controlling autonomic nerves. *Experimental Biology and Medicine*, *228*(10), 1138–1145.

- Nagai, K., & Suda, T. (1985). Antineoplastic effects of carnosine and beta-alanine--physiological considerations of its antineoplastic effects. *Journal of the Physiological Society of Japan*, 48(11), 741–747.
- Okuma, E., & Abe, H. (1992). Major buffering constituents in animal muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 102(1), 37–41.
- Parviz, M., Vogel, K., Gibson, K. M., & Pearl, P. L. (2014). Disorders of GABA metabolism: SSADH and GABA-transaminase deficiencies. *Journal of Pediatric Epilepsy*, 3(4), 217–227.
- Pegova, A., Abe, H., & Boldyrev, A. (2000). Hydrolysis of carnosine and related compounds by mammalian carnosinases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 127(4), 443–446.
- Peiretti, P. G., Medana, C., Visentin, S., Giacotti, V., Zunino, V., & Meineri, G. (2011). Determination of carnosine, anserine, homocarnosine, pentosidine and thiobarbituric acid reactive substances contents in meat from different animal species. *Food Chemistry*, 126(4), 1939–1947.
- Peters, V., Kebbewar, M., Jansen, E. W., Jakobs, C., Riedl, E., Koepfel, H., Frey, D., Adelman, K., Klingbeil, K., & Mack, M. (2010). Relevance of allosteric conformations and homocarnosine concentration on carnosinase activity. *Amino Acids*, 38(5), 1607–1615.
- Pfister, F., Riedl, E., Wang, Q., vom Hagen, F., Deinzer, M., Harmsen, M. C., Molema, G., Yard, B., Feng, Y., & Hammes, H.-P. (2011). Oral carnosine supplementation prevents vascular damage in experimental diabetic retinopathy. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 28(1), 125–136.
- Phillipson, O. T. (2014). Management of the aging risk factor for Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 35(4), 847–857.
- Preston, J. E., Hipkiss, A. R., Himsworth, D. T. J., Romero, I. A., & Abbott, J. N. (1998). Toxic effects of B-amyloid (25–35) on immortalised rat brain endothelial cell: protection by carnosine, homocarnosine and B-alanine. *Neuroscience Letters*, 242(2), 105–108.
- Riedl, E., Pfister, F., Braunagel, M., Brinkkötter, P., Sternik, P., Deinzer, M., Bakker, S. J. L., Henning, R. H., van den Born, J., & Krämer, B. K. (2011). Carnosine prevents apoptosis of glomerular cells and podocyte loss in STZ diabetic rats. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 28(2), 279–288.
- Rothschild, M. F., & Ruvinsky, A. (2011). *The genetics of the pig*. Wallingford, UK: CAB International.
- Rude, J. I., Gervais, J.-P., & Felt, M.-H. (2010). *Detecting COOL Impacts on US-Canada Bilateral Hog and Pork Trade Flows*. Canadian Agricultural Trade Policy And Competitiveness Research Network.

- Sakata, K., Yamashita, T., Maeda, M., Moriyama, Y., Shimada, S., & Tohyama, M. (2001). Cloning of a lymphatic peptide/histidine transporter. *Biochemical Journal*, 356(1), 53–60.
- Sale, C., Artioli, G. G., Gualano, B., Saunders, B., Hobson, R. M., & Harris, R. C. (2013). Carnosine: From exercise performance to health. *Amino Acids*, 44(6), 1477–1491.
- Sasawatari, S., Okamura, T., Kasumi, E., Tanaka–Furuyama, K., Yanobu–Takanashi, R., Shirasawa, S., Kato, N., & Toyama–Sorimachi, N. (2011). The solute carrier family 15A4 regulates TLR9 and NOD1 functions in the innate immune system and promotes colitis in mice. *Gastroenterology*, 140(5), 1513–1525.
- Sauerhöfer, S., Yuan, G., Braun, G. S., Deinzer, M., Neumaier, M., Gretz, N., Floege, J., Kriz, W., Van der Woude, F., & Moeller, M. J. (2007). L-carnosine, a substrate of carnosinase-1, influences glucose metabolism. *Diabetes*, 56(10), 2425–2432.
- Schmid, A. (2010). Bioactive substances in meat and meat products. *Fleischwirtschaft International*, 2, 127–133.
- Soliman, K. M., Mohamed, A. M., & Metwally, N. S. (2007). Attenuation of some metabolic deteriorations induced by diabetes mellitus using carnosine. *Journal of Applied Sciences*, 7, 2252–2260.
- Statistique Canada. (2011). Recettes monétaires agricoles. *Publications de statistique Canada*, 21-011-X.
- Statistique Canada. (2012). Les stocks totaux de porcs et de truies au 1er juillet, Canada, 1992 à 2012. *Publications de statistique Canada*, 23-010-X.
- Statistique Canada. (2014a). Revenu agricole net. *Publications de statistique Canada*, 12(1), 53.
- Statistique Canada. (2014b). L'industrie agricole et agroalimentaire canadienne et l'économie mondiale en 2013-2014. *Financement agricole Canada*, 31196 E 20.
- Stellingwerff, T., Decombaz, J., Harris, R. C., & Boesch, C. (2012). Optimizing human in vivo dosing and delivery of B-alanine supplements for muscle carnosine synthesis. *Amino Acids*, 43(1), 57–65.
- Stordy, G. (2012). La production et les exportations canadiennes de porc apportent 9.28 milliards \$ à l'économie. *Conseil canadien du Porc*, 29–30.
- Straadt, I. K., Aaslyng, M. D., & Bertram, H. C. (2014). An NMR-based metabolomics study of pork from different crossbreeds and relation to sensory perception. *Meat Science*, 96(1), 719–728.
- Suzuki, Y., Ito, O., Mukai, N., Takahashi, H., & Takamatsu, K. (2002). High level of skeletal

muscle carnosine contributes to the latter half of exercise performance during 30-s maximal cycle ergometer sprinting. *The Japanese Journal of Physiology*, 52(2), 199–205.

Suzuki, Y., Ito, O., Takahashi, H., & Takamatsu, K. (2004). The effect of sprint training on skeletal muscle carnosine in humans. *International Journal of Sport and Health Science*, 2, 105–110.

Tallon, M. J., Harris, R. C., Boobis, L. H., Fallowfield, J. L., & Wise, J. A. (2005). The carnosine content of vastus lateralis is elevated in resistance-trained bodybuilders. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 19(4), 725–729.

Teufel, M., Saudek, V., Ledig, J. P., Bernhardt, A., Boularand, S., Carreau, A., Cairns, N. J., Carter, C., Cowley, D. J., Duverger, D., Ganzhorn, A. J., Guenet, C., Heintzelmann, B., Laucher, V., Sauvage, C., & Smirnova, T. (2003). Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), 6521–6531.

Thwaites, D. T., & Anderson, C. M. H. (2007). H<sup>+</sup>-coupled nutrient, micronutrient and drug transporters in the mammalian small intestine. *Experimental Physiology*, 92(4), 603–619.

Thwaites, D. T., & Anderson, C. M. H. (2011). The SLC36 family of proton-coupled amino acid transporters and their potential role in drug transport. *British Journal of Pharmacology*, 164(7), 1802–1816.

Trombley, P. Q., Horning, M. S., & Blakemore, L. J. (2000). Interactions between carnosine and zinc and copper: implications for neuromodulation and neuroprotection. *Biochemistry. Biokhimiia*, 65(7), 807–816.

Uchida, S., Kwon, H. M., Yamauchi, A., Preston, A. S., Marumo, F., & Handler, J. S. (1992). Molecular cloning of the cDNA for an MDCK cell Na<sup>+</sup>- and Cl<sup>-</sup>-dependent taurine transporter that is regulated by hypertonicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(17), 8230–8234.

Unno, H., Yamashita, T., Ujita, S., Okumura, N., Otani, H., Okumura, A., Nagai, K., & Kusunoki, M. (2008). Structural basis for substrate recognition and hydrolysis by mouse carnosinase CN2. *Journal of Biological Chemistry*, 283(40), 27289–27299.

Verret, B. (2010). Portrait de l'industrie porcine. *Fédération des producteurs de porcs du Québec*, 15.

Yamashita, T., Shimada, S., Guo, W., Sato, K., Kohmura, E., Hayakawa, T., Takagi, T., & Tohyama, M. (1997). Cloning and functional expression of a brain peptide/histidine transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 272(15), 10205–10211.

Yang, P., Hao, Y., Feng, J., Lin, H., Feng, Y., Wu, X., Yang, X., & Gu, X. (2014). The expression of carnosine and its effect on the antioxidant capacity of longissimus dorsi muscle in finishing pigs exposed to constant heat stress. *Asian-Australasian Journal of Animal*

*Sciences*, 27(12), 1763–1772.

Yankner, B. A., Duffy, L. K., & Kirschner, D. A. (1990). Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein:reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*, 250(4978), 279–282.

Zwarycz, B., & Wong, E. A. (2013). Expression of the peptide transporters PepT1, PepT2, and PHT1 in the embryonic and posthatch chick. *Poultry Science*, 92(5), 1314–1321.

